



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO MORFOLÓGICO E IMUNOHISTOQUÍMICO DA EXPRESSÃO DE PCNA E P63 NO
CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL EM GATOS

MARIANA CARRILHO CARVALHO DA SILVA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

Doutora Esmeralda Sofia da Costa Delgado

Mestre Hugo Abel Sampaio Monteiro Martins Pissarra

ORIENTADOR

Mestre Hugo Abel Sampaio Monteiro Martins Pissarra

CO-ORIENTADOR

Doutora Lisa Alexandra Pereira Mestrinho

2016

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO MORFOLÓGICO E IMUNOHISTOQUÍMICO DA EXPRESSÃO DE PCNA E P63 NO
CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL EM GATOS

MARIANA CARRILHO CARVALHO DA SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

Doutora Esmeralda Sofia da Costa Delgado

Mestre Hugo Abel Sampaio Monteiro Martins Pissarra

ORIENTADOR

Mestre Hugo Abel Sampaio Monteiro Martins Pissarra

CO-ORIENTADOR

Doutora Lisa Alexandra Pereira Mestrinho

2016

LISBOA

Agradecimentos

Ao Dr. Hugo Pissarra por ter aceite ser meu orientador, mesmo já suspeitando do mau feitio que iria ter de aturar. Muito obrigada por ter estado sempre disponível para as minhas dúvidas existenciais mesmo estando de férias, a qualquer hora, através de qualquer meio de comunicação. Espero poder continuar a refilar consigo e vice-versa durante muito tempo.

À professora Lisa Mestrinho pela ideia da tese, pelo apoio, pelo fornecimento de dados e sobretudo por ter confiado em mim para desenvolver este trabalho.

Ao Dr. Nuno Leal por também ter contribuído com o fornecimento de dados imprescindíveis à realização deste estudo.

Ao Dr. Gonçalo Vicente por todo o acompanhamento ao longo do estágio, mais do que um excelente médico e um modelo a seguir, demonstrou ser um amigo sempre preocupado connosco tanto a nível profissional como pessoal.

À Dr.^a Sandra Carvalho por ser o “anjinho da guarda” da imuno, sempre pronta a ajudar. É uma pena não termos muito contato com o Laboratório de Anatomia Patológica ao longo do curso, pois para além de ser um prazer trabalhar convosco, acredito que aprenderíamos muito consigo e com a restante equipa.

Ao Dr. Telmo Nunes pela disponibilidade demonstrada relativamente ao estudo estatístico.

A toda a equipa do HE-FMV-UL, médicos, enfermeiros e auxiliares, que nos recebem naquela fase em que pouco ou nada sabemos e, ano após anos, mostram sempre a mesma disponibilidade e boa disposição em ensinar-nos. Agradeço imenso terem-nos mostrado a importância do trabalho em equipa e serem capazes de tornar o Hospital, simultaneamente, num excelente local de trabalho e de lazer. Espero que a “mais tiazoca” também vos tenha ensinado alguma coisa (esta foi especialmente para si menina Patrícia).

Ao grupo de estagiários que, para além de colegas de referência, mostraram ser grandes amigos. Obrigada por toda a ajuda, todos os jantares e lanchinhos de despedida (espero que estes continuem e que venha sempre mais um a seguir à chamada “última despedida”). De facto, um grupo muito homogéneo, com um grande espírito de entreaajuda, que vai ser para sempre reconhecido como um dos melhores que passou pelo HE-FMV-UL (palavras de toda a equipa).

Ao meu grupo de amigos por me fazer ver que há vida para além da veterinária, por não me fazerem esquecer de quem sou, por todo o apoio e por finalmente perceberem que o meu curso é mais do que “meter a mão dentro da vaca” ou “dar festinhas a cãesinhos e a gatinhos”.

À minha família por me ter dado a oportunidade de ter animais desde que me lembro da minha existência, o que me permitiu descobrir esta minha paixão desde muito cedo. Obrigada por terem insistido sempre que seguisse o que me fizesse mais feliz, fosse qual fosse o custo (literalmente). Sem dúvida o meu grande pilar, sem os quais nada disto seria possível.

Por último, um especial agradecimento ao CP, por nos ter acompanhado ao longo de grande parte do nosso estágio sempre com o “apêndice a abanar” até ao último momento. São cães como este, que nos mostram que vale a pena ser veterinário e que compensam todo o esforço e dedicação.

Resumo

Estudo morfológico e imunohistoquímico da expressão de PCNA e p63 no carcinoma espinocelular oral em gatos

O carcinoma espinocelular oral (CECO) é uma neoplasia maligna derivada do epitélio pavimentoso estratificado, sendo o tumor maligno mais comum em gatos com mais de 10 anos de idade. O CECO felino desenvolve-se sobretudo a nível da gengiva (40-50%), seguindo-se a língua (2-10%) e tonsilas (2-15%). À semelhança do Homem, este tumor é localmente invasivo e de difícil tratamento uma vez que, é frequentemente diagnosticado numa fase avançada.

Este estudo reuniu os seguintes objetivos: avaliação das características clinicopatológicas na altura do diagnóstico e sua relação com o prognóstico, determinado através do tempo de sobrevivência, e a relação destas e do prognóstico com a expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e da proteína p63.

As características clinicopatológicas incluíram a idade, o sexo, a localização primária do tumor, a classificação T, a classificação N, o estágio tumoral, o Sistema de Graduação Histopatológica do Grau de Malignidade da OMS, o Sistema de Graduação Histopatológica de Broder, o Sistema de Graduação Histopatológica Multifatorial de Anneroth et al. e o Sistema de Graduação das Margens Invasivas de Bryne et al., em 20 casos de CECO em gatos. O prognóstico foi avaliado através da determinação do tempo de sobrevivência e a expressão de PCNA e p63 através da marcação imunohistoquímica utilizando os anticorpos anti-PCNA (clone PC-10, Dako) e anti-p63 (clone 7 JUL, Novocastra).

A localização primária do tumor parece ser um bom indicador de prognóstico ($p = 0,032$). Os sistemas de graduação histopatológica mais relevantes na previsão do prognóstico de doentes com CECO são o da OMS ($p = 0,009$) e o de Broder ($p = 0,015$).

A expressão de PCNA encontrou-se relacionado de forma estatisticamente significativa com a classificação T e o estágio tumoral ($p = 0,005$), com o Sistema de Graduação Histopatológica do Grau de Malignidade da OMS ($p = 0,012$) e com o Sistema de Graduação Histopatológica de Broder ($p = 0,013$). A expressão de p63 parece ser um indicador preditivo da metastização dos linfonodos regionais ($p = 0,048$).

Palavras chave: PCNA, p63, sistemas de graduação histopatológica, carcinoma espinocelular oral, gato.

Abstract

Morphologic and immunohistochemical study of feline oral squamous cell carcinoma: p63 and PCNA

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is a malignant neoplasm derived from stratified squamous epithelium, being the most common malignant tumor in cats over 10 years old. Feline OSCC occurs especially at the gums (40-50%), followed by the tongue (2-10%) and tonsils (2-15%). Similar to humans, this tumor is locally invasive and difficult to treat as it is often diagnosed at an advanced stage.

This study reunited the following objectives: evaluation of clinicopathological characteristics at the time of diagnosis and their relationship with prognosis, determined by the overall survival time, and the relation of the same histopathological characteristics and prognosis with the expression of the nuclear antigen of cellular proliferation (PCNA) and p63 protein.

The clinicopathological characteristics included age, gender, tumor location, T classification, N classification, tumor stage, the World Health Organization (WHO) Grading System, the Broder's Histopathological Grading System, the Anneroth's et al. Multifactorial Grading System and the Bryne's et al. Deep Invasive Cell Grading System in 20 cases of feline OSCC. The prognosis was evaluated through the overall survival time and the PCNA and p63 expression by the immunohistochemical staining with anti-PCNA (clone PC-10, Dako) and anti-p63 (clone 7 JUL, Novocastra) antibodies.

The primary location of the tumor appears to be a good survival predictor ($p = 0.032$). The most relevant histopathologic grading systems in the prediction of prognosis of patients with OSCC are the WHO ($p = 0.009$) and the Broder's ($p = 0.015$) grading systems.

The PCNA expression was statistically associated with T classification and tumor stage ($p = 0.005$), WHO Grading System ($p = 0.012$) and Broder's Histopathological Grading System ($p = 0.013$). The expression of p63 seems to be a predictive indicator of metastatic regional lymph nodes ($p = 0.048$).

Keywords: PCNA, p63, histopathological grading systems, oral squamous cell carcinoma, feline.

Índice Geral

Lista de Gráficos.....	viii
Lista de Quadros.....	viii
Lista de Tabelas.....	ix
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	x
Introdução.....	1
I – Relatório de atividades desenvolvidas no estágio curricular	2
II – Revisão bibliográfica	6
1. Oncologia comparada.....	6
2. Histologia da mucosa oral	8
2.1. Mucosa oral normal.....	8
2.2. Carcinoma espinocelular oral.....	11
3. Carcinoma espinocelular oral	13
3.1. No Homem	13
3.2. No gato	13
3.3. Etiologia e fatores de risco	14
3.4. Aspetos clínicos.....	15
3.5. Diagnósticos diferenciais	16
3.6. Diagnóstico.....	16
3.7. Estadiamento	18
3.8. Graduação histopatológica	20
3.9. Tratamento	28
3.10. Prognóstico	30
3.11. Marcadores moleculares no carcinoma espinocelular oral: do gato ao homem	31
III – Aspetos clinicopatológicos e marcação imunohistoquímica para PCNA e p63 no carcinoma espinocelular oral felino	41
1. Objetivos do trabalho experimental.....	41
2. Material e métodos	42
2.1. Amostra em estudo.....	42
2.2. Processamento das amostras para os estudos de imunohistoquímica	42
2.3. Diagnóstico e exame histopatológico.....	43
2.4. Técnica de imunohistoquímica.....	43
2.5. Análise estatística.....	46
3. Resultados.....	47
3.1. Caracterização clinicopatológica da população	47

3.2.	Classificação histopatológica do CECO felino.....	50
3.3.	Caracterização da marcação para o PCNA e p63	51
3.4.	Relação entre as características clinicopatológicas e o tempo de sobrevivência.....	54
3.5.	Relação entre as características clinicopatológicas e os índices de marcação do PCNA e do p63.....	57
3.6.	Relação entre a intensidade de marcação do p63 e a percentagem de células marcadas para o p63	59
3.7.	Relação entre os índices de marcação do PCNA e do p63	59
4.	Discussão	61
5.	Conclusão e perspectivas futuras	65
	Bibliografia	66
	Anexos	75
	Anexo I – Tabelas para análise de testes de correlação	75

Lista de Figuras

Figura 1: Principais componentes da mucosa oral (adaptado de Nanci, 2012b).....	9
Figura 2: Principais aspetos estruturais das células epiteliais nas sucessivas camadas (adaptado de Nanci, 2012b).	11
Figura 3: Histologia dos diferentes graus do CECO humano (adaptado de Re et al., 2014).	12
Figura 4: Carcinoma espinocelular sublingual felino (Imagem original).	16
Figura 5: Detecção imunohistoquímica de PCNA na mucosa oral normal de humano (ampliação x10) (adaptado de Poosarla et al., 2015).	33
Figura 6: Detecção imunohistoquímica do PCNA nos diferentes graus de CECO humano (adaptado de Poosarla et al., 2015).....	34
Figura 7: Isoformas do p63.	36
Figura 8: Mucosa oral normal em humano (adaptado de Foschini et al., 2004).....	38
Figura 9: Detecção imunohistoquímica do p63 nos diferentes graus de CECO humano (adaptado de Re et al., 2014).....	39
Figura 10: Imunoreatividade negativa do p63 em pérolas de queratina no CECO humano e marcação de células localizadas na periferia das ilhotas tumorais (coloração ABC, ampliação x100) (adaptado de Chen et al., 2004).....	39
Figura 11: Aspetto histológico dos diferentes graus de CECO felino.	50
Figura 12: Infiltrado linfoplasmocitário no CECO felino.....	50
Figura 13: CECO felino bem diferenciado com invasão perineural.	51
Figura 14: Imunomarcação do PCNA em diferentes graus de CECO felino.....	52
Figura 15: Imunomarcação do p63 em diferentes graus de CECO felino.	53
Figura 16: Curvas ROC e melhores valores de corte do índice de marcação de PCNA e de p63 em 20 pacientes com CECO felino.....	53
Figura 17: Curvas de <i>Kaplan-Meier</i> comparando a estimativa da sobrevivência, em dias, dos doentes com marcação baixa e alta de PCNA ($p = 0,151$) e de p63 ($p = 0,130$).....	54
Figura 18: Curvas de <i>Kaplan-Meier</i> comparando a estimativa da sobrevivência, em dias, dos doentes de acordo com a localização primária do tumor ($p = 0,032$).....	55
Figura 19: Curvas de <i>Kaplan-Meier</i> comparando a estimativa da sobrevivência, em dias, dos 20 casos de CECO felino de acordo com os diferentes graus obtidos segundo os sistemas de graduação histopatológica da OMS ($p = 0,009$) e de Broder ($p = 0,015$).	55

Figura 20: Diagrama de dispersão com valor de r_s correspondente entre o índice de marcação de p63 e da sua intensidade de marcação de 20 casos de CECO felino. 60

Figura 21: Diagrama de dispersão com valor de r_s correspondente entre o índice de marcação de PCNA e de p63 de 20 casos de CECO felino. 60

Lista de Gráficos

Gráfico 1: Frequência relativa do tempo despendido nos diferentes serviços do HE-FMV-UL durante o estágio curricular. 2

Gráfico 2: Frequência relativa da distribuição da localização primária do CECO felino. 47

Lista de Quadros

Quadro 1: Classificação TNM para tumores da cavidade oral felinos (adaptado de Owen, 1980). 19

Quadro 2: Grupos de estadiamento para tumores da cavidade oral felinos (adaptado de Owen, 1980). 19

Quadro 3: Sistema de Graduação Histopatológica de Broder (adaptado de Lourenço et al., 2007). 21

Quadro 4: Sistema de Graduação Histopatológica Multifatorial de Anneroth et al. (adaptado de Anneroth et al., 1987). 22

Quadro 5: Grupos de graduação baseados na soma do total de pontos obtidos pela escala de Anneroth et al. (adaptado de Akhter et al., 2011). 23

Quadro 6: Sistema de Graduação das Margens Invasivas de Bryne et al. (adaptado de Bryne et al., 1992). 24

Quadro 7: Grupos prognósticos baseados na soma do total de pontos obtidos pela escala de Bryne et al. (adaptado de Bryne et al., 1992). 24

Quadro 8: Sistema de Avaliação Histopatológica de Risco de Brandwein-Gensler et al. (adaptado de Brandwein-Gensler et al., 2010). 25

Quadro 9: Pontuação de risco baseada na soma do total de pontos obtidos pela escala de Brandwein-Gensler et al. (adaptado de Brandwein-Gensler et al., 2010). 26

Quadro 10: Sistema de Graduação Histopatológica do Grau de Malignidade da OMS (adaptado de Lourenço et al, 2007). 26

Quadro 11: Modelo BD de Almangush et al. (adaptado de Almangush et al., 2015). 28

Quadro 12: Anticorpos primário utilizados. 43

Quadro 13: Protocolo usado para recuperação antigénica e diluição dos anticorpos.	44
---	----

Lista de Tabelas

Tabela 1: Classificação da graduação histopatológica de acordo com os sistemas da OMS e de Broder de 20 casos de CECO felino.	48
Tabela 2: Classificação da graduação histopatológica de acordo com o sistema de Anneroth et al. de 20 casos de CECO felino.	49
Tabela 3: Classificação da graduação histopatológica de acordo com o sistema de Bryne et al. de 20 casos de CECO felino.	49
Tabela 4: Correlação entre o tempo de sobrevivência (dias) e as características clinicopatológicas de 20 casos de CECO felino.	56
Tabela 5: Correlação entre o tempo de sobrevivência (dias) e o índice de marcação de PCNA e de p63 em 20 casos de CECO felino.	57
Tabela 6: Correlação entre o índice de marcação de PCNA e de p63 e as características clinicopatológicas de 20 casos de CECO felino.	58
Tabela 7: Teste de Tukey para os dados encontrados na Tabela 6 que mostraram significância com o índice de marcação de PCNA.	59

Lista de Abreviaturas e Símbolos

AJCC: American Joint Committee on Cancer

ANOVA: Analysis of variance

B: *Tumor budding*

BD: *Tumor budding and depth of invasion* (Modelo BD)

CAMVs: Centros de Atendimento Médico-Veterinários

CEC: Carcinoma espinocelular

CECO: Carcinoma espinocelular oral

D: *Depth of invasion*

EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid*

EMT: *Epithelial Mesenchymal Transition*

FMV-UL: Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

H&E: Hematoxilina-Eosina

HE-FMV-UL: Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

LAP-FMV-UL: Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

M: Metástases à distância

MO: Microscópio ótico

N: Linfonodos regionais

OMS: Organização Mundial de Saúde

PAAF: Punção aspirativa por agulha fina

PBS: *phosphate buffered saline*

PCNA: Antígeno nuclear de proliferação celular

RM: Ressonância Magnética

ROC: *Receiver Operating Characteristics*

T: Tumor primário

TC: Tomografia Computorizada

TNM: Tumor-Linfonodo-Metástase (Sistema de classificação TNM)

UICC: Union for Cancer Control

VPH: Vírus do papiloma humano

Introdução

O estudo do carcinoma espinocelular oral felino, bem como do canino, tem mostrado grande interesse em oncologia comparada devido às semelhanças encontradas com o carcinoma espinocelular oral humano tanto a nível do comportamento biológico do tumor, como das suas características clínicas e moleculares. A vantagem que o modelo de estudo felino apresenta sobre o canino diz respeito à maior casuística encontrada nesta espécie para este tumor (Cannon, 2015). A maioria dos gatos apresenta um estágio avançado da doença na altura do diagnóstico pelo que, normalmente, acabam por ser sujeitos a eutanásia, independentemente da terapêutica (Wypij, 2013). Os carcinomas espinocelulares orais felinos são clinicamente muito agressivos, sendo o seu prognóstico reservado (Radlinsky, 2013; Willard, 2014). Assim, é imperativo identificar novas formas de diagnóstico e de terapêutica de maneira a tentar combater o mau prognóstico associado a este tumor (Myoung et al., 2006).

O sistema TNM de classificação dos tumores malignos tem sido o padrão de classificação usado para fazer o estadiamento dos tumores contudo, visto que nas últimas décadas poucos progressos têm sido conseguidos no que toca ao aumento do período de sobrevivência, outras classificações histopatológicas têm sido propostas a fim de complementar este sistema e auxiliar na escolha terapêutica (Lourenço, Schueler, Camisasca, Lidenblatt & Bernardo, 2007).

Uma eventual abordagem diagnóstica poderá ser a utilização de marcadores biológicos que permitam estabelecer um consenso entre a clínica e o diagnóstico histopatológico (Lo Muzio et al., 2005; de Sousa et al., 2009). O PCNA é talvez o marcador do índice de proliferação mais utilizado, sendo capaz de monitorizar a maior parte das fases do ciclo celular, sendo que o seu padrão de marcação permite ainda fazer alguma distinção das mesmas (Iatropoulos & Williams, 1996; Madewell, 2001). Recentemente, tem havido um interesse acrescido no estudo do p63 devido a inúmeros fatores que sugerem o seu papel oncogénico na regulação da proliferação e na transformação de lesões pré-malignas em malignas de origem epitelial (Lo Muzio et al., 2005).

A presente dissertação organiza-se da seguinte forma: o primeiro capítulo consiste no relatório das atividades desenvolvidas ao longo do estágio curricular; o segundo capítulo corresponde à revisão bibliográfica acerca do carcinoma espinocelular oral felino no que respeita à sua fisiopatologia clínica, a métodos de diagnóstico, a sistemas de graduação histopatológica e a possíveis medidas terapêuticas a aplicar; por fim, o terceiro capítulo, inclui o estudo retrospectivo dos aspetos clinicopatológicos e da marcação imunohistoquímica para o PCNA e p63 em 20 casos de carcinoma espinocelular oral felino.

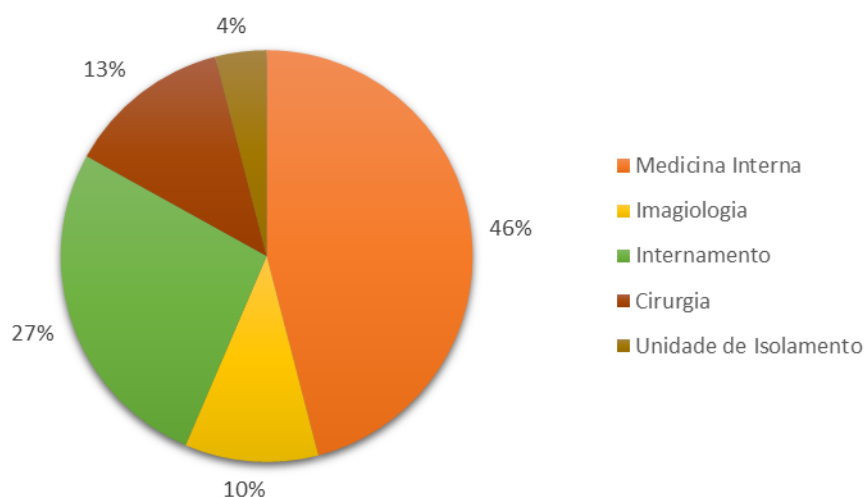
I – Relatório de atividades desenvolvidas no estágio curricular

O estágio curricular, efetuado no 6º ano do Curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL), realizou-se no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (HE-FMV-UL) no período compreendido entre 7 de Setembro de 2015 e 24 de Fevereiro de 2016, perfazendo um total de 992 horas. A frequência relativa do tempo despendido nos diferentes serviços do HE-FMV-UL durante o estágio curricular encontra-se resumida no Gráfico 1.

O estágio no HE-FMV-UL compreende uma rotação pelos seguintes serviços: medicina interna, imagiologia, internamento, cirurgia e unidade de isolamento. Todas as atividades por mim desenvolvidas foram auxiliadas e supervisionadas pelos médicos veterinários dos respetivos serviços. Fez também parte das minhas responsabilidades auxiliar os estudantes do 3º, 4º e 5º ano na prática da disciplina de atividades hospitalares.

Ao longo do estágio curricular tive também a oportunidade de acompanhar as atividades do meu orientador no Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (LAP-FMV-UL).

Gráfico 1: Frequência relativa do tempo despendido nos diferentes serviços do HE-FMV-UL durante o estágio curricular.



Medicina Interna

Ao longo do estágio curricular, 46% do tempo foi dedicado à área de medicina interna, correspondendo a 416 horas no total.

O serviço de medicina interna engloba primeiras consultas, de rotina, de seguimento ou mesmo de referência (por ordem de chegada ou por marcação), nas mais diversas áreas de especialidade: medicina preventiva, comportamento animal, neurologia, ortopedia, oftalmologia, odontologia, dermatologia, cardiologia, reprodução, gastroenterologia, oncologia, endocrinologia e animais exóticos.

Por norma, neste serviço, as minhas principais responsabilidades consistiam na recolha da história pregressa e anamnese do animal, na execução do exame de estado geral e, caso necessário, do exame neurológico e/ou ortopédico. Posteriormente, seguia-se uma breve explicação do caso ao clínico responsável, o qual prosseguia com a consulta discutindo possíveis planos de vacinação, diagnósticos diferenciais, planos de diagnóstico e terapêuticas médicas e cirúrgicas a instituir. Ao longo deste tempo, outras tarefas por mim efetuadas compreendiam a contenção dos animais, a preparação e administração de fármacos pelas diferentes vias, a cateterização endovenosa, a preparação de sistemas de soro, a colheita de amostras biológicas (sangue, urina, fezes, entre outras), a execução de exames citológicos (por PAAF ou zaragatoa), o envio de material para o laboratório, a elaboração de receitas para prescrição de medicamentos (posteriormente conferidas e assinadas pelo clínico responsável), as drenagens abdominais e torácicas, entre outras.

O serviço de oncologia também contou com a minha colaboração, fazendo parte das minhas funções a receção dos animais junto dos seus proprietários, assim como o esclarecimento de algumas dúvidas, a pesagem dos animais, a cateterização endovenosa e colocação dos animais a soro conforme necessário, a recolha de sangue para hemograma e bioquímicas, a análise e interpretação desses resultados, o auxílio na preparação dos medicamentos quimioterápicos e a sua posterior administração.

Imagiologia

No serviço de imagiologia, que compreendeu 10% do tempo do estágio curricular, foi possível participar na realização de técnicas de imagem como a radiografia (abdominal e torácica), mielografia, tomografia computadorizada (TC) e ecografia (abdominal, do sistema reprodutor e ecocardiografia). O meu papel era ajudar na contenção e correto posicionamento dos animais, na

sedação, na anestesia, na intubação endotraqueal, na monitorização anestésica, na discussão dos resultados de imagem obtidos e na realização de relatórios. No caso particular do serviço de ecografia, também fez parte das minhas funções auxiliar na tricotomia do animal bem como na recolha de amostras biológicas por cistocentese, por toracocentese, por pericardiocentese e por citologias ecoguiadas.

Internamento

Relativamente às atividades do serviço de internamento, estas foram efetuadas em turnos de 12 horas (tanto em regime diurno, como noturno) completando um total de 264 horas (27% do estágio). O turno iniciava-se sempre com uma discussão dos casos clínicos dos animais internados seguindo-se a sua monitorização, realização de passeios, limpeza das jaulas e dos animais, alimentação, fisioterapia, preparação e administração de fármacos e de fluidoterapia, de acordo com os horários previamente estabelecidos pelo HE-FMV-UL. Quando necessário, também se procedia à cateterização endovenosa, medição da pressão sanguínea e da glicémia, colheita de amostras biológicas, algaliação, limpeza e desinfeção de feridas, pensos e enemas.

A entrega dos animais aos proprietários aquando da alta médica, com as devidas explicações de cuidados e terapêuticas a adotar prescritas pelo clínico responsável, fez também parte das minhas responsabilidades.

Por vezes, o HE-FMV-UL também recebia cães da GNR com o intuito de participarem como dadores no Banco de Sangue Veterinário, fazendo parte das minhas funções auxiliar na contenção do animal ou na colheita de sangue, conforme necessário.

Cirurgia

A componente cirúrgica, a qual ocupou 13% do tempo de estágio, para além da cirurgia propriamente dita, envolvia também o acompanhamento pré e pós cirúrgico do animal.

O acompanhamento pré-cirúrgico incluía a receção do animal junto do seu proprietário, o preenchimento da sua ficha de internamento (características do animal, cirurgia a realizar, cirurgião responsável, peso vivo no dia, principais sinais clínicos, terapêutica em curso, doenças previamente diagnosticadas, entre outros), cateterização endovenosa, cálculo da dose de fluidoterapia, preparação e administração da medicação pré-cirúrgica e de indução anestésica, intubação endotraqueal e preparação do animal (tricotomia e assepsia) e do material cirúrgico.

No bloco cirúrgico, tive a possibilidade de presenciar cirurgias de tecidos moles, de ortopedia e de neurocirurgia, desempenhando papel de circulante, anestesista, instrumentista ou ajudante de cirurgião.

No período pós-cirúrgico, as atividades focavam-se na remoção do tubo endotraqueal, monitorização dos sinais vitais dos animais e aquecimento dos mesmos. Quando possível, compareci também à reavaliação pós-cirúrgica, na qual participava na desinfecção das feridas, na remoção de pontos e na realização de vários tipos de pensos.

Por fim, também me foi possível assistir a procedimentos de endoscopia digestiva, rinoscopia, broncoscopia e vídeo-otoscopia.

Unidade de Isolamento

A Unidade de Isolamento para internamento de animais portadores de doenças infetocontagiosas, ocupou cerca de 4% do estágio curricular. As funções desempenhadas coincidiam com aquelas previamente descritas para o serviço de internamento. Para além disso, tinha como responsabilidade atualizar a ficha de internamento presente no internamento do HE-FMV-UL, com os novos dados clínicos relativos ao animal.

II – Revisão bibliográfica

1. Oncologia comparada

A oncologia comparada é uma área da medicina que se dedica, como o próprio nome indica, ao estudo comparativo dos tumores que ocorrem naturalmente nas espécies veterinárias, nomeadamente, na sua etiologia, biologia e terapêutica. Esta área possibilita o desenvolvimento de novas abordagens em oncologia veterinária e também em oncologia humana já que muitas espécies poderão funcionar como verdadeiros modelos da doença no Homem (Paolini & Vail, 2013).

Apesar dos avanços recentes em genética molecular terem contribuído para um melhor conhecimento da carcinogénese, continua a faltar informação útil, relativa aos tratamentos eficazes no controlo da doença oncológica. Muitas vezes, pode ocorrer ineficácia da terapêutica antineoplásica ou reações inesperadas ou imprevistas tais como toxicidade. Tais efeitos não são previstos nos modelos pré-clínicos, o que enfatiza a necessidade de recorrer a modelos oncológicos animais alternativos e potencialmente com maior relevância biológica (Wypij, 2013).

Neste sentido, os animais de companhia (cão e gato) comparativamente com os animais de laboratório possuem a vantagem da ocorrência espontânea, assemelhando-se mais ao comportamento natural do carcinoma espinocelular oral (CECO) humano. Neste sentido, poderão prever com maior precisão as eventuais respostas do tumor ao tratamento. Embora os gatos domésticos sejam usados como modelo na investigação de várias doenças não neoplásicas, como por exemplo, doenças oftalmológicas hereditárias e diabetes tipo 2, até à data, o cão tem sido o foco em oncologia comparada. Isto pode dever-se ao facto de o genoma felino só ter sido descoberto, na sua totalidade, muito recentemente, enquanto que o genoma canino está disponível desde 2005. No entanto, tanto os cães como os gatos, compartilham uma série de características que os tornam bons modelos de estudo: são animais imunocompetentes, nos quais se desenvolvem tumores espontâneos, sujeitos aos mesmos fatores de risco ambiental que os seres humanos; têm um tempo de vida útil mais curto e uma progressão tumoral mais rápida, o que permite recolher dados e retirar conclusões mais rapidamente, potencializando a identificação de terapias com êxito em experimentação humana; a ausência de um tratamento padrão para muitos tipos de cancro em animais, permite a utilização de novas terapias em animais não sujeitos a tratamentos prévios e obtendo também uma maior informação acerca da toxicidade e eficácia. O gato poderá ser um modelo superior ao cão em relação a alguns tumores específicos, tais como o

carcinoma espinocelular oral (CECO) e os tumores mamários agressivos, pelo facto de serem mais frequentes nesta espécie (Cannon, 2015).

Para além das semelhanças encontradas entre CECO felino e humano, relativamente às suas características clínicas e ao comportamento biológico do tumor, também muitos aspetos moleculares são comuns, tais como: sobre-expressão do EGFR, alteração da expressão do p53, desregulação da expressão do CK2 e sobre-expressão de marcadores de angiogénese e das enzimas ciclooxigenase e lipoxigenase (Cannon, 2015; Supsavhad, Dirksen, Martin & Rosol, 2015).

2. Histologia da mucosa oral

2.1. Mucosa oral normal

A cavidade oral divide-se em duas partes, separadas pelo osso alveolar e a gengiva:

- (1) vestíbulo exterior, delimitado pelos lábios e as bochechas;
- (2) cavidade oral propriamente dita, que é constituída dorsalmente pelos palatos duro e mole, ventralmente pela língua e pelo assoalho da boca e delimitada posteriormente pelos pilares das fauces e pelas tonsilas.

A mucosa oral é uma camada de tecido superficial que cobre toda a boca e é contínua com a pele a nível dos lábios. Embora a mucosa oral seja contínua com a pele, estas diferem em algumas características, sendo que, a primeira apresenta uma aparência mais corada, uma superfície húmida e ausência de apêndices tais como folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas, contendo apenas pequenas glândulas salivares na submucosa (Nanci, 2012b).

A mucosa oral é composta por um epitélio pavimentoso estratificado, queratinizado ou não, dependendo da região, e uma lâmina própria de tecido conjuntivo laxo rico em vasos sanguíneos, linfáticos e células musculares lisas, apresentando também algumas vezes glândulas e tecido linfóide (Figura 1) (Gama, 2008). Na superfície de contato entre o epitélio e a lâmina própria subjacente, existe uma interface irregular devido à presença de papilas de tecido conjuntivo que se inserem no epitélio e a presença de uma lâmina basal que requer uma coloração especial para ser vista ao microscópio ótico (MO) (Nanci, 2012b).

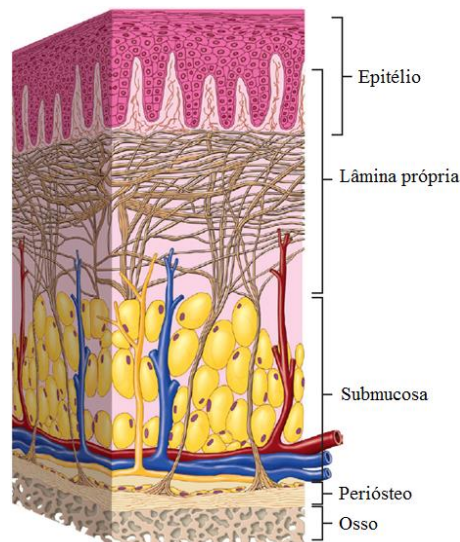
Histologicamente, a mucosa oral pode ser classificada em três tipos:

- (1) mastigatória;
- (2) de revestimento;
- (3) especializada.

A mucosa mastigatória, observada na gengiva e palato duro, é a camada mais queratinizada de forma a proteger a mucosa oral de agressões mecânicas durante a mastigação. A lâmina própria nessas regiões possui várias papilas e repousa diretamente sobre o perióstio. A mucosa de revestimento, constituída por um epitélio pavimentoso não queratinizado, reveste o palato mole, lábios, bochechas e o assoalho da boca, sendo o mais flexível possível de modo a exercer a sua função de proteção. A lâmina própria possui papilas similares àsquelas observadas na derme e é contínua com a submucosa, a qual contém glândulas salivares menores distribuídas difusamente, não estando fortemente ligada às estruturas subjacentes. Finalmente, a língua é coberta por uma

mucosa especializada contendo diferentes papilas (fungiformes, filiformes, foliadas e circunvaladas) e botões gustativos (Gama 2008; Nanci, 2012a).

Figura 1: Principais componentes da mucosa oral (adaptado de Nanci, 2012b).



O epitélio oral pavimentoso estratificado queratinizado, cujas células predominantes são os queratinócitos, está dividido em diferentes camadas distinguindo-se, respetivamente, da camada mais interna próxima à lâmina basal, à camada mais superficial, as seguintes: basal, espinhosa, granulosa e córnea (Figura 2, A). A camada basal, em conjunto com a camada espinhosa (embora em menor número), apresenta intensa atividade mitótica responsável por um processo de renovação celular contínuo de forma a manter a integridade estrutural do epitélio oral. Conforme as células migram em direção à superfície, vão sofrendo processos de maturação e de diferenciação, de modo a substituir aquelas que são descamadas para formar uma camada superficial protetora. O padrão de maturação difere em diferentes regiões da mucosa oral, podendo identificar-se dois tipos:

- (1) queratinização ou cornificação, no caso da mucosa mastigatória;
- (2) não queratinização, como acontece na mucosa de revestimento.

Estima-se que a taxa de renovação celular da gengiva demore entre 41 a 57 dias e cerca de 25 dias na bochecha. O tempo de renovação celular varia conforme a região da mucosa oral uma vez que, epitélios menos queratinizados têm uma renovação mais rápida que os mais queratinizados (Nanci, 2012b).

Queratinização

A camada basal é formada por células prismáticas ou cuboidais, basófilas, sendo rica em células-tronco do epitélio oral. As células da camada basal contêm filamentos intermediários de queratina, que se vão tornando mais numerosos à medida que as células avançam para a superfície. A camada espinhosa é constituída por células cuboidais ou ligeiramente achatadas, de núcleo central, citoplasma com curtas expansões que contêm feixes de filamentos de queratina (citoqueratinas), as quais se aproximam e se mantêm unidas com as das células vizinhas por meio de desmossomas, o que dá a cada célula um aspeto espinhoso aquando do processamento histológico. As citoqueratinas e os desmossomas desempenham um papel importante na manutenção da coesão entre as células do epitélio e na resistência ao atrito. A camada granulosa contém células poligonais achatadas, núcleo central e citoplasma carregado de grânulos basófilos, denominados grânulos de querato-hialina. A camada lúcida apresenta uma delgada camada de células achatadas, eosinófilas e translúcidas, sem núcleo e com um citoplasma repleto de filamentos de queratina compactados. Ainda se pode observar desmossomas entre as células. A camada córnea é constituída por células achatadas, mortas e sem núcleo e o seu citoplasma encontra-se repleto de queratina (Moraes, 2008).

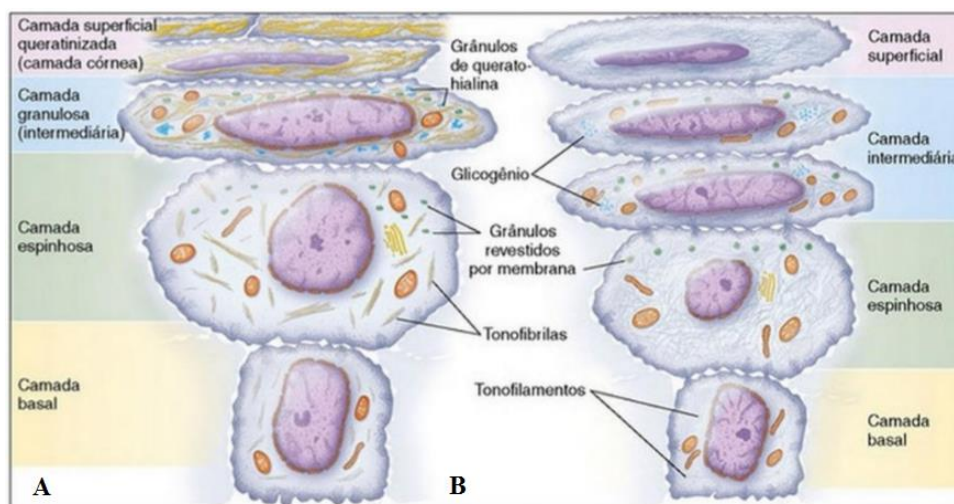
A composição dos filamentos de queratina vai-se modificando à medida que os queratinócitos se diferenciam. As células da camada basal apresentam queratinas de baixo peso molecular, enquanto os queratinócitos mais diferenciados sintetizam queratinas de peso molecular maior. Na camada córnea estes filamentos aglutinam-se com uma matriz formada por grânulos de querato-hialina, os quais libertam o precursor da proteína filagrina que, ao associar-se aos filamentos de citoqueratina, promove o colapso e o achatamento dos queratinócitos. Nessa altura da diferenciação, os queratinócitos estão transformados em corneócitos, presos uns aos outros por meio de desmossomas modificados que, ao sofrerem degradação proteolítica, descamam continuamente (Moraes, 2008; Nanci, 2012b).

Não queratinização

As camadas basal e espinhosa do epitélio oral pavimentoso estratificado não queratinizado apresentam-se, geralmente, semelhantes às descritas para o epitélio queratinizado, embora as células do epitélio não queratinizado sejam ligeiramente maiores e os desmossomas sejam menos evidentes. Acima da camada espinhosa, no epitélio não queratinizado, não ocorrem alterações

súbitas no aspeto das células pelo que, a metade externa do tecido é dividida em camadas intermediária e superficial (Figura 2, B) (Nanci, 2012b).

Figura 2: Principais aspetos estruturais das células epiteliais nas sucessivas camadas (adaptado de Nanci, 2012b).



Legenda: (A) Epitélio oral queratinizado. (B) Epitélio oral não queratinizado.

2.2. Carcinoma espinocelular oral

A transformação de um epitélio normal num epitélio neoplásico, é o resultado de uma série de mutações genéticas que levam a uma perda progressiva dos mecanismos de controlo celular e apoptose e, conseqüentemente, a alterações na diferenciação e proliferação celular (de Sousa, Paradella, Carvalho & Rosa, 2009).

Sob o ponto de vista histológico o CECO felino caracteriza-se, geralmente, por uma proliferação epitelial que forma ninhos ou ilhotas de células escamosas pleomórficas com núcleos hipercromáticos, nucléolos evidentes e figuras mitóticas atípicas. Esses tumores são, na grande maioria dos casos, bastante agressivos localmente e invadem os tecidos subjacentes (Johnson et al., 2005; Bilgic, 2015).

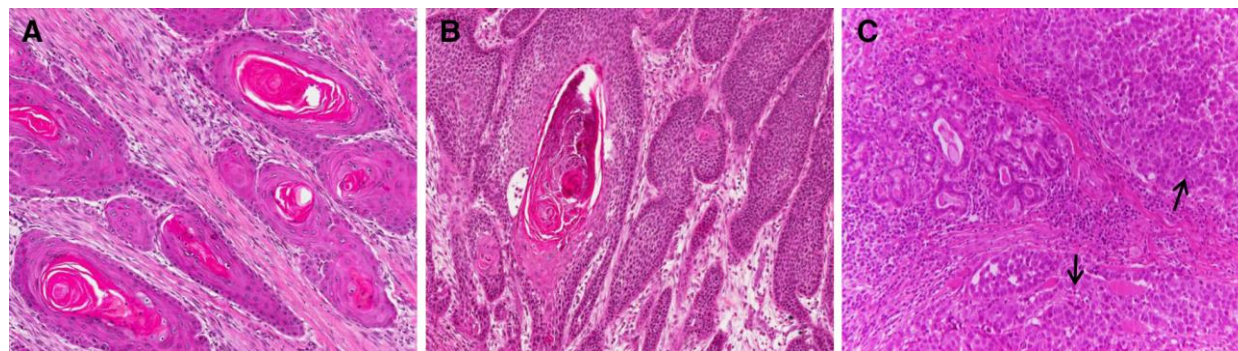
Os tumores bem diferenciados apresentam diferenciação escamosa, podendo esta ser extensa ou restrita a pequenos focos. Nestes tumores, também se verificam frequentemente formações concêntricas de queratina (pérolas córneas) e desmossomas visíveis (pontes intercelulares). Nos tumores menos diferenciados há uma atividade mitótica significativa. Nestes, os marcadores imunohistoquímicos para citoqueratina são uteis na determinação do diagnóstico definitivo (Figura 3) (Gelberg, 2009; Bilgic, 2015).

Os carcinomas espinocelulares (CECs) linguais apresentam-se, geralmente, constituídos por um epitélio escamoso bem diferenciado, formação de pérolas de queratina, muitas mitoses e núcleos hipercromáticos. A invasão dos tecidos moles e do músculo esquelético desencadeia uma proliferação do tecido conjuntivo (desmoplasia) e também a atrofia do músculo (Head, Else & Dubielzig, 2002).

O carcinoma espinocelular (CEC) da gengiva possui a capacidade de infiltrar o osso mandibular sob a forma de massas queratinizadas de tipo trabecular, com uma taxa de mitose baixa a moderada e apenas algumas pérolas de queratina. Neste caso ocorre remodelação óssea devido à osteólise e substituição por tecido conjuntivo reativo (Hutson, Willaner, Walder, Stone & Klein, 1992).

A quantidade de tecido fibroso é variável em cada tumor. Alguns carcinomas induzem uma resposta esquirrosa, enquanto outros apresentam extensas áreas de necrose causadas pelo rápido crescimento tumoral pela perda da contiguidade com o suprimento sanguíneo (Gelberg, 2009). As invasões angiolinfáticas e perineurais são também sinais de malignidade (Johnson et al., 2005).

Figura 3: Histologia dos diferentes graus do CECO humano (adaptado de Re et al., 2014).



Legenda: (A) CEC da laringe bem diferenciado com presença de pérolas córneas e infiltrado inflamatório intratumoral. (B) CEC da laringe moderadamente diferenciado com algumas pérolas córneas. (C) CEC da laringe pouco diferenciado, escassas áreas queratinizadas (setas) e moderado infiltrado inflamatório (coloração H&E, ampliação x10).

3. Carcinoma espinocelular oral

3.1. No Homem

O CECO, também denominado carcinoma de células escamosas ou carcinoma epidermóide, é uma neoplasia maligna derivada do epitélio pavimentoso estratificado que representa cerca de 95% de todas as neoplasias malignas que ocorrem na cavidade oral (Scully & Bagan, 2009). O CECO humano é a sexta neoplasia mais comum na Europa e nos Estados Unidos, sendo também comum em países em desenvolvimento, incluindo o Sul Asiático (Supravhad et al., 2015). Ao longo dos anos, tem vindo a verificar-se um aumento na incidência de CECs orais (Wang, Zhang, Yue & Wang, 2013). A taxa de sobrevivência aos 5 anos para este tipo de tumor é de cerca de 50% (Supravhad et al., 2015).

A etiologia do CECO é multifatorial, sendo o tabaco, em conjunto com a ingestão de bebidas alcoólicas, os principais fatores de risco (Anantharaman et al., 2014). A radiação solar, particularmente os raios ultravioletas, é a principal causa de carcinomas de pele, sendo também responsável pela etiologia dos CECs do lábio inferior (Cotran & Kumar, 2005). O vírus do papiloma humano (VPH) tem influência em diversos tumores, como o carcinoma da orofaringe (60% dos CECs nesta localização contêm evidências do VPH), laringe, esófago, colo de útero, vulva e pênis (Doorbar, 2007). No caso do CECO, o VPH está associado a um comportamento menos agressivo da doença e a um melhor prognóstico (Cannon, 2015). Para além disso, parece que muitos dos casos de CECs orais surgem de distúrbios pré-existentes, tais como leucoplasia e eritroplasia (Cannon, 2015).

Apesar dos progressos em quimioterapia, radioterapia e terapia direcionada verificados nas últimas décadas, o prognóstico do CECO continua a ser reservado devido à agressiva invasão local pelo tumor e à metastização que levam a que haja recorrência tumoral (Wang et al., 2013).

3.2. No gato

Os tumores orais abrangem neoplasias que surgem da mucosa, língua, periodonto, tecido odontogénico, mandíbula, maxila, tonsilas e lábios. A cavidade oral é o quarto local mais comum de neoplasias no gato, correspondendo a 7% dos tumores malignos nesta espécie. O CECO é o tumor oral maligno mais comum em gatos, constituindo 60 a 80% dos casos (Radlinsky, 2013). Outros tumores orais tais como o fibrossarcoma constitui 10 a 20% e os restantes – tumores odontogénicos, melanomas, linfomas – compreendem menos de 3% dos tumores orais. A raça,

gênero ou cor da pelagem não parecem influenciar a ocorrência de tumores orais (Bradley, Schmidt & Crystal, 2011). Os CECs ocorrem usualmente em gatos com mais de 10 anos de idade (Radlinsky, 2013).

A maioria dos tumores na orofaringe rostral são localmente invasivos, invadindo muitas vezes o osso e possuindo um baixo potencial metastático, enquanto que os tumores na orofaringe caudal tendem a ser infiltrativos e metastizar mais rapidamente (Radlinsky, 2013).

O CECO felino desenvolve-se sobretudo a nível da gengiva (40-50%), seguindo-se a língua (2-10%) e tonsilas (2-15%) (Carvalho, 2006; Supsavhad, 2015). O CEC gengival felino, ao contrário do cão, apresenta um pior prognóstico, pois tende a ser altamente invasivo e osteolítico embora tenha baixa taxa de metastização (Radlinsky, 2013). O CEC da língua pode ocorrer tanto em gatos como em humanos, sendo pouco frequente o seu aparecimento noutras espécies. Quando aparece nos gatos, normalmente ocorre na zona sublingual e na linha média perto do frénulo, contrariamente ao que acontece no ser humano, no qual costuma aparecer na zona lateral da língua (Supsavhad, 2015). Apesar de frequentemente parecer histologicamente agressivo, apenas uma pequena percentagem das neoplasias linguais desenvolve metástases, vulgarmente a nível dos linfonodos regionais: o mandibular e o retrofaríngeo medial. O CEC tonsilar é mais comum em canídeos, sendo que cresce rapidamente e está associado à invasão local precoce e a uma alta taxa de metastização nos linfonodos e pulmões (Gelberg, 2009; Radlinsky, 2013).

3.3. Etiologia e fatores de risco

Enquanto que em medicina humana o aparecimento de tumores orais está, de certa forma, associado a alguns fatores de risco, a etiologia dos mesmos em animais de companhia é ainda desconhecida. Contudo, sabe-se que os gatos que usam coleiras anti-pulgas têm 5,3 vezes mais probabilidade de vir a desenvolver CECO do que os que não usam, podendo isto ser justificado pelo facto dos gatos, durante a sua auto-higienização, poderem estar em contato com os pesticidas libertados pela coleira. O mesmo acontece com animais cujo regime alimentar é baseado em dietas húmidas, passando a ter uma probabilidade acrescida de 3,6 vezes de vir a desenvolver CECO. Para além disso, gatos que comem atum enlatado quando comparados com aqueles que comem predominantemente comida seca, têm também um risco acrescido de 4,7 vezes. Estes riscos acrescidos foram atribuídos às diferenças na constituição dos alimentos ou à alta incidência de doença periodontal em gatos que comem dietas húmidas. Os gatos que coabitam com fumadores, ao serem sujeitos à mesma contaminação ambiental que os seus

proprietários, tanto por inalação quanto por ingestão oral durante sua auto-higienização, têm duas vezes maior risco de vir a desenvolver CECO (Bertone, Snyder & Moore, 2003; Snyder et al., 2004). Esta exposição pode originar mutações do p53, uma proteína supressora tumoral que regula o crescimento e a proliferação celular, prevenindo a divisão celular descontrolada e que, ao sofrer mutações, resulta na produção e na anormal acumulação do p53 não-funcional dentro das células. Biópsias de amostras tumorais demonstraram que gatos expostos ao fumo do cigarro no ambiente, tinham 4,5 vezes mais probabilidade de sobre expressar o p53, do que os gatos não expostos (Bilgic, Duda, Sánchez & Lewis, 2015).

Embora o papilomavírus possa estar envolvido no aparecimento do CEC cutâneo e já tenha sido isolado de papilomas orais em gatos, ainda não foi demonstrada a sua influência no CECO. Já a evolução de condições inflamatórias pré-existentes, como a doença periodontal e a estomatite, para CECO, é frequentemente observada (Cannon, 2015).

3.4. Aspetos clínicos

Os animais com tumores localizados na cavidade oral rostral geralmente são apresentados à consulta quando os donos se deparam com uma massa visível. Uma vez que os tumores rostrais são detetados mais cedo e, como tal, são geralmente de menores dimensões, há uma maior probabilidade de conseguir a sua excisão cirúrgica completa. Tendo o tumor uma localização mais caudal, pode passar despercebido, uma vez que é de mais difícil observação.

Os carcinomas de células escamosas variam tanto em tamanho como em aparência macroscópica – de superfície lisa a irregular (Gelberg, 2009). Nestes tumores, a massa é vermelha, friável, vascularizada e, algumas vezes, ulcerada (Figura 4) (Radlinsky, 2013).

Muitas vezes, a suspeita de neoplasia oral ocorre durante a profilaxia dentária de rotina. Uma característica de neoplasia oral é a presença de alguma mobilidade dentária num doente com uma boa dentição geral. Disfagia, dificuldade na apreensão do alimento, ptialismo, halitose, anorexia, perda de peso, sangramento, assimetria facial, aumento dos linfonodos mandibular ou retrofaríngeo, exoftalmia, diminuição da auto-higienização, letargia, espirros e corrimento nasal são características comuns a estes tumores (Snyder et al., 2004; Henry & Higginbotham, 2010; Willard, 2014; Bilgic, 2015).

Figura 4: Carcinoma espinocelular sublingual felino (Imagem original).



3.5. Diagnósticos diferenciais

Os diagnósticos diferenciais a considerar para o CECO felino incluem doença periodontal, lesões orais benignas, infecções da cavidade oral e outros tumores orais malignos. A mobilidade dentária associada ao CECO pode ser mal interpretada quando está presente doença periodontal em simultâneo. Lesões orais benignas que podem ser confundidas com CECO incluem, hiperplasia gengival, granulomas eosinofílicos, pólipos nasofaríngeos, expansão do osso alveolar, osteoma e, tumores benignos invasivos decorrentes do ligamento periodontal ou do epitélio laminar dentário (como por exemplo, odontomas e epúlides/ameloblastomas). Infecções bacterianas (e.g. abscessos, granulomas, osteomielites, actinomicoses) e fúngicas (e.g. criptococose, blastomicoses) também podem assemelhar-se ao CECO. Por fim, outros tumores orais malignos podem também ser confundidos com o CECO tais como o fibrossarcoma, o schwannoma, o linfoma, o melanoma, o osteossarcoma, o condrossarcoma, o adenocarcinoma salivar, o linfoma das células com grânulações, o hemangiossarcoma, o mastocitoma, entre outros (Henry & Higginbotham, 2010, Bilgic, 2015).

3.6. Diagnóstico

O diagnóstico deve iniciar-se com o exame físico de forma a avaliar a massa oral e outros sinais clínicos compatíveis com CECO (Bradley et al., 2011). Contudo, uma avaliação visual pode subestimar o tamanho do tumor, pois estas massas tendem a ser mais extensas e invasivas do que aparentam no exame físico (Henry & Higginbotham, 2010; Bilgic, 2015). Assim, de modo a avaliar a verdadeira extensão da lesão, o grau de invasão tumoral e o planeamento cirúrgico, pode recorrer-se a radiografias de crânio e dentárias, TC e ressonância magnética (RM). Estas, são

geralmente técnicas imagiológicas mais sensíveis do que as radiografias na determinação da extensão da lesão e, podem ainda, fornecer informação relativa aos linfonodos regionais (mandibular e retrofaríngeo) (Bradley et al., 2011; Bilgic, 2015). Contudo, as radiografias permitem examinar a presença de osteólise, proliferação periosteal e ainda de reabsorção dentária, uma vez que, mais de 50% dos tumores orais associados à gengiva acompanham-se de destruição óssea observável radiograficamente (Henry & Higginbotham, 2010; Bilgic, 2015). A avaliação de metástases, nos linfonodos regionais e à distância, é necessária para o estadiamento tumoral. A palpação dos linfonodos regionais nos cães é um mau indicador da metastização dos mesmos, não havendo estudos neste âmbito nos gatos (Bilgic et al., 2015). Assim, mesmo que os linfonodos regionais não se encontrem aumentados, deve ser realizada uma citologia por punção aspirativa por agulha fina (PAAF) dos mesmos, sendo que esta já demonstrou ter elevada sensibilidade e especificidade no caso dos linfonodos mandibulares do cão. Se na citologia forem identificadas metástases nos linfonodos, estes podem ser removidos na altura da cirurgia local, contudo, poderá não vir a ser curativo devido à potencial presença de micrometástases noutros locais (Bradley et al., 2011; Bilgic, 2015). Embora a taxa global de metástases pulmonares no momento do diagnóstico seja relativamente baixa (14% ou menos para todas as neoplasias malignas orais), em caso de suspeita de uma neoplasia maligna, deverão ser feitas três projeções radiográficas torácicas de forma a despistar a sua presença. Caso existam metástases pulmonares, a cirurgia local não vai ser curativa (Willard, 2014).

Os métodos de diagnóstico dependem da localização do tumor e da facilidade de recolha da amostra uma vez que, massas friáveis e localizadas rostralmente podem ser facilmente recolhidas sob sedação leve, enquanto que a anestesia geral pode ser necessária para a biópsias de massas mais caudais ou propensas a sangrar excessivamente (Henry & Higginbotham, 2010). A análise histopatológica é um método de diagnóstico definitivo, sendo crucial para diferenciar lesões inflamatórias e massas benignas que podem muitas vezes, assemelhar-se a tumores malignos (Henry & Higginbotham, 2010). É necessário obter uma amostra grande e profunda por biópsia uma vez que, é crucial diferenciar os tumores malignos dos granulomas eosinofílicos. O aspeto superficial de muitas massas da cavidade oral é ulcerado e necrosado devido à proliferação da flora bacteriana oral normal, dificultando a interpretação desta porção da lesão (Willard, 2014). Quando as lesões são pequenas e superficiais, a biópsia excisional com intenção curativa poderá ser uma abordagem. A biópsia incisional é recomendada para lesões maiores ou mais invasivas,

uma vez que o planeamento do tratamento irá variar de acordo com a histologia e o grau do tumor (Henry & Higginbotham, 2010).

Uma PAAF da massa oral, para além de requerer que o doente esteja anestesiado e nesse caso, é sempre preferível fazer uma biópsia, pode também originar resultados falso-negativos, devido às infeções secundárias e à inflamação (Bradley et al., 2011; Bilgic, 2015).

3.7. Estadiamento

O estadiamento tumoral tem como principais objetivos prever a resposta clínica à terapêutica e estabelecer o respetivo prognóstico dos doentes (Edge & Compton, 2010). Myoung et al. (2006) e Bhargava, Saigal e Chalishazar (2010), comprovaram-no ao demonstrar que o estágio do tumor é, de facto o fator de prognóstico mais importante.

O estadiamento do CECO é feito de acordo com um conjunto de regras aceites internacionalmente, desenvolvidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Trata-se do sistema TNM de classificação dos tumores malignos e baseia-se no tamanho e características do tumor primário (letra T), a extensão aos linfonodos regionais (letra N) e na presença ou ausência de metástases à distância (letra M). Uma vez determinados os três parâmetros, os seus valores são registados conjuntamente a fim de determinar o estágio adequado. As categorias de estadiamento clínico TNM variam de estágio I a IV (Owen, 1980; Sawazaki-Calone, 2014) (Quadros 1 e 2). Quanto maior for o estágio de classificação, pior é o prognóstico (Edge & Compton, 2010).

A desvantagem mais marcante no uso deste sistema consiste na elevada taxa de metástases ocultas loco-regionais e na dificuldade em não conseguir prever as variações de comportamento biológico dos tumores, conduzido frequentemente a erros de classificação deste sistema (Keski-Säntti, Atula, Tikka, Hollmén, Mäkitie & Leivo, 2007).

Contudo, segundo o artigo de Sawazaki-Calone (2014), vários estudos sugerem que a graduação histopatológica detalhada da peça cirúrgica, aliada ao sistema TNM, seja atualmente o melhor critério para a previsão do prognóstico de doentes com CECO.

Quadro 1: Classificação TNM para tumores da cavidade oral felinos (adaptado de Owen, 1980).

Classificação TNM	
Tumor primário (T)	
T0	Sem evidência de neoplasia
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Diâmetro tumoral < 2cm
T1a	Sem evidência de invasão óssea
T1b	Com evidência de invasão óssea
T2	Diâmetro tumoral entre 2-4cm
T2a	Sem evidência de invasão óssea
T2b	Com evidência de invasão óssea
T3	Diâmetro tumoral > 4cm
T3a	Sem evidência de invasão óssea
T3b	Com evidência de invasão óssea
Linfonodos regionais (N)	
N0	Sem evidência de metástases nos linfonodos regionais
N1	Linfonodo regional ipsilateral móvel
N1a	Sem evidência de metástases nos linfonodos regionais
N1b	Evidência de metástases nos linfonodos regionais
N2	Linfonodo regional contralateral móvel
N2a	Sem evidência de metástases nos linfonodos regionais
N2b	Evidência de metástases nos linfonodos regionais
N3	Linfonodo regional fixo
Metástases à distância (M)	
M0	Sem evidência de metástases
M1	Evidência de metástases à distância

Quadro 2: Grupos de estadiamento para tumores da cavidade oral felinos (adaptado de Owen, 1980).

Grupos de estadiamento			
Estádio	T	N	M
I	T1	N0, N1 ou N2a	M0
II	T2	N0, N1a ou N2a	M0
III	T3	N0, N1 ou N2a	M0
	Qualquer T	N1b	M0
IV	Qualquer T	N2b ou N3	M0
	Qualquer T	Qualquer N	M1

3.8. Graduação histopatológica

A graduação consiste na avaliação histopatológica do grau de diferenciação dos CECs, sendo que estes graus determinam a semelhança do tumor ao seu tecido de origem (epitélio escamoso) (Johnson et al., 2005).

Desde há muitos anos que o sistema TNM de classificação dos tumores malignos tem sido o padrão de classificação escolhido para fazer o estadiamento dos tumores, recomendar a terapia mais adequada a cada caso, e ainda, tentar estimar a sobrevida dos doentes. Contudo, os doentes portadores de estádios precoces de CECO morrem, por vezes, mais rapidamente do que o esperado, mesmo quando sujeitos à terapêutica correta e atempada. Neste sentido, outras classificações histopatológicas para os CECs orais têm sido propostas na tentativa de explicar os diferentes comportamentos biológicos de tumores com características clínicas semelhantes a fim de complementar o sistema TNM e auxiliar na escolha terapêutica (Lourenço, Schueler, Camisasca, Lidenblatt & Bernardo, 2007).

Uma vez que ainda não existe um consenso na literatura acerca de qual o sistema de classificação histopatológica que possui um maior valor preditivo nos casos de CECO, deverão ser feitas mais investigações neste sentido (Sawazaki-Calone, 2014).

3.8.1. Sistemas de graduação histopatológica

3.8.1.1. Sistema de Graduação Histopatológica de Broder

Broder propôs, em 1920, um sistema de graduação histopatológica totalmente dissociado da história clínica, baseado apenas no grau de diferenciação celular, no qual os carcinomas são divididos em quatro classes de acordo com o grau obtido, sendo o grau 4 o de pior prognóstico (Quadro 3) (Lourenço et al., 2007).

Porém, embora a classificação de Broder tenha sido utilizada durante décadas, muitos autores questionam o valor desta classificação, destacando o papel de outras características histopatológicas no comportamento biológico do CECO (Lourenço et al., 2007) e, referindo não terem encontrado uma associação significativa desta com o prognóstico (Bhargava et al., 2010; Doshi, Shah, Patel & Jhabuawala, 2011; Jamadar, Narayan, Shreedhar, Mohanty & Shenoy, 2014; Sawazaki-Calone et al., 2015). Porém, Akhter, Hossain, Rahman e Molla (2011) concluíram que este sistema pode ser usado para prever o índice de metastização dos linfonodos.

Este sistema de classificação tem como principais problemas o facto de o CECO exibir uma população de células heterogénea, com diferentes graus de diferenciação (Anneroth, Batsakis & Luna, 1987), de ser um sistema subjetivo e não possuir características relacionadas com a génese do tumor e com o padrão de invasão (Sawazaki-Calone et al., 2015).

Quadro 3: Sistema de Graduação Histopatológica de Broder (adaptado de Lourenço et al., 2007).

Sistema de Graduação Histopatológica de Broder	
Parâmetro	Características
Grau 1	0 a 25% de células indiferenciadas
Grau 2	25 a 50% de células indiferenciadas
Grau 3	50 a 75% de células indiferenciadas
Grau 4	75 a 100% de células indiferenciadas

3.8.1.2. Sistema de Graduação Histopatológica Multifatorial de Anneroth et al.

Em 1984, Anneroth e os seus colaboradores criaram um sistema de graduação multifatorial para o CECO, tendo como referência uma outra classificação multifatorial elaborada em 1973 por Jakobsson et al. para carcinomas de laringe. Este sistema assenta em dois critérios: a população de células tumorais e a relação tumor/hospedeiro. Enquanto que, o primeiro critério avalia parâmetros como a estrutura, o grau de queratinização, o pleomorfismo nuclear e o número de mitoses nas partes mais indiferenciadas do tumor, o segundo, avalia o padrão de invasão, o estágio de invasão e o infiltrado linfoplasmocitário (Quadro 4) (Johnson et al., 2005; Lourenço et al., 2007). De seguida, são atribuídos pontos que variam entre 1 a 4 a cada um destes parâmetros e, posteriormente, estes são somados de forma a obter uma pontuação final, correspondente ao grau do tumor (Quadro 5) (Akhter et al., 2011).

O principal objetivo foi propor uma classificação que não se restringisse apenas à avaliação de células tumorais, como a classificação de Broder, mas que também considerasse a relação entre o tumor e o tecido conjuntivo subjacente uma vez que, as partes histologicamente mais invasivas de um tumor, poderão conter as células com maior probabilidade de metastização (Bhargava et al., 2010).

Este sistema de classificação mostrou ter uma correlação estatisticamente significativa com o estadiamento clínico dos tumores e com o prognóstico segundo o estudo de Lourenço et al. (2007), Bhargava et al. (2010), Akhter et al. (2011), Ribeiro, Martinez, Silva, Faria, Camisasca e

de Queiroz Chaves Lourenço (2012) e Jamadar et al. (2014). De modo contrário, no estudo de Doshi et al. (2011), não foi apurada qualquer associação com o prognóstico.

Quadro 4: Sistema de Graduação Histopatológica Multifatorial de Anneroth et al. (adaptado de Anneroth et al., 1987).

Sistema de Graduação Histopatológica Multifatorial de Anneroth et al.				
Relativo à população celular do tumor				
Parâmetros morfológicos	Pontuação			
	1	2	3	4
Estrutura	Lençóis sólidos e /ou configuração papilar	Fileiras e cordões	Pequenos grupos de células	Dissociação celular marcante
Padrão de queratinização	Altamente queratinizada	Queratinização moderada	Queratinização mínima	Sem queratinização
Aberrações Nucleares	Poucas	Moderadamente abundantes	Poucos núcleos grandes e anaplásicos	Abundante e muitos núcleos grandes e anaplásicos
Número de mitoses	Poucas (0-2)	Número moderado (3-4)	Numerosas (5-6)	Extremamente numerosas
Relativo à relação tumor-hospedeiro				
Parâmetros morfológicos	Pontuação			
	1	2	3	4
Modo de invasão	Membrana basal bem definida	Membrana basal menos nítida	Membrana basal indistinguível	Membrana basal indistinguível e invasão difusa
Estágio de invasão	Duvidosa ou microinvasão	Invasão nítida, mas envolvendo apenas a lâmina própria	Invasão abaixo da lâmina própria	Invasão massiva ampla e profunda
Resposta inflamatória	Marcante	Moderada	Leve	Nenhuma

Quadro 5: Grupos de graduação baseados na soma do total de pontos obtidos pela escala de Anneroth et al. (adaptado de Akhter et al., 2011).

Grupos de graduação	
Grau I	5-10
Grau II	11-15
Grau III	16-20
Grau IV	>20

3.8.1.3. Sistema de Graduação das Margens Invasivas de Bryne et al.

Em 1989, Bryne et al. propuseram um novo sistema de graduação histopatológica de malignidade para o CECO, baseado em modificações do sistema proposto por Anneroth et al., do qual retiraram o parâmetro histopatológico referente ao estágio de invasão. Mais tarde, em 1992, também o parâmetro relativo ao número de mitoses foi removido desta classificação. Neste sistema, apenas são avaliadas as áreas mais anaplásicas dentro dos locais mais invasivos do tumor (a chamada frente invasiva do tumor), por serem as mais importantes para o prognóstico do doente. Os eventos considerados importantes para a disseminação tumoral, como o ganho e a perda de moléculas de adesão, a secreção de enzimas proteolíticas, o aumento da proliferação celular, a diminuição da apoptose e a iniciação da angiogénese que ocorrem na frente de invasão tumoral, possuem muitas vezes comportamentos diferentes nas regiões central e periférica do mesmo tumor. Posteriormente, são atribuídos valores de 1 a 4 à intensidade do grau de queratinização, ao pleomorfismo nuclear, ao infiltrado linfoplasmocitário e à forma com que o padrão de invasão da frente tumoral se apresenta (Quadro 6) (Johnson et al., 2005; Lourenço et al., 2007; Bhargava et al., 2010). No final, os valores atribuídos a cada parâmetro histopatológico são somados e classificados em três grupos de acordo com o prognóstico da doença (Quadro 7) (Bryne, Kippang, Lilleng & Kjaerheim, 1992).

Este sistema de classificação de Bryne et al. apresenta como vantagens o facto de ser de mais rápida execução uma vez que, apenas as frentes de invasão tumoral são estudadas e possuir um elevado valor prognóstico (Lourenço et al., 2007).

Contudo, os resultados relativamente a este tipo de classificação têm sido controversos. Enquanto alguns autores referem não haver associação significativa entre este sistema e o prognóstico (de Castro Ribeiro et al., 2012; Sawazaki-Calone et al., 2015), outros constataram precisamente o contrário (Störkel, Reichert, Reiffen & Wagner, 1993; Bhargava et al., 2010; Doshi et al., 2011; Jamadar et al., 2014). Esta inconsistência pode ser justificada pela subjetividade atribuída a alguns parâmetros deste sistema. Além disso, a imaturidade celular não deve ser utilizada na

avaliação do pleomorfismo celular, conforme sugerido por Bryne et al., uma vez que a frente invasiva do tumor apresenta um menor grau de diferenciação celular e um maior grau de dissociação celular, em comparação com as restantes partes do mesmo (Kato et al, 2011; Sawazaki-Calone et al., 2015).

Quadro 6: Sistema de Graduação das Margens Invasivas de Bryne et al. (adaptado de Bryne et al., 1992).

Sistema de Graduação das Margens Invasivas de Bryne et al.				
Parâmetros morfológicos	Pontuação			
	1	2	3	4
Grau de queratinização	Altamente queratinizado (>50% das células)	Moderadamente queratinizado (20-50% das células)	Queratinização mínima (5-20% das células)	Sem queratinização (0-5% das células)
Pleomorfismo nuclear	Pouco pleomorfismo nuclear (>75% das células maduras)	Moderadamente abundante pleomorfismo nuclear (50-75% das células maduras)	Abundante pleomorfismo nuclear (25-50% das células maduras)	Extremo pleomorfismo nuclear (0-25% das células maduras)
Padrão de invasão	Compressivo, superfície infiltrante bem delineada	Infiltrante, cordões sólidos, bandas ou fios	Pequenos grupos ou cordões de células infiltrantes (n>15)	Marcante e disseminada dissociação em grupos pequenos e/ou em células individuais (n<15)
Infiltrado linfoplasmocitário	Marcante	Moderado	Leve	Ausente

Quadro 7: Grupos prognósticos baseados na soma do total de pontos obtidos pela escala de Bryne et al. (adaptado de Bryne et al., 1992)

Grupos prognósticos	
Bom prognóstico	4-8
Prognóstico moderado	9-12
Prognóstico reservado	13-16

3.8.1.4. Sistema de Avaliação Histopatológica de Risco de Brandwein-Gensler et al.

Em 2005, Brandwein-Gensler et al. introduziram um novo sistema de avaliação histopatológica de risco para o CECO, defendendo ser fortemente preditiva da recorrência tumoral e da taxa de sobrevivência dos doentes. Este sistema de classificação baseia-se em três critérios, sendo eles o pior padrão de invasão, a invasão perineural e a presença de infiltrado linfocitário. Relativamente ao padrão de invasão, os valores atribuídos a este critério foram baseados no trabalho de Bryne et al., variando de 1 a 4, e foi acrescentado um padrão 5, que corresponde a uma infiltração tumoral vastamente disseminada, com pelo menos 1mm de tecido saudável interposto entre as ilhotas tumorais e a frente de invasão do tumor (Quadro 8). Segundo os autores, também a pontuação pode servir como base para a decisão de recomendar ou não radioterapia adjuvante, já que ficou demonstrado que somente os doentes de alto risco beneficiariam de radioterapia pós-cirúrgica, com aumento da sua sobrevida total. Similarmente ao sistema de Bryne et al., as pontuações são somadas e classificadas em três grupos de risco (Quadro 9) (Lourenço et al., 2007).

Também este sistema apresenta algumas divergências entre diversos autores. Enquanto que uns confirmam o valor preditivo deste modelo (de Castro Ribeiro et al., 2012), outros mostraram haver falta de correlação entre este sistema com o prognóstico (Sawazaki-Calone et al., 2015). De acordo com de Castro Ribeiro et al. (2012), este sistema de classificação é o melhor método para prever o comportamento biológico do CECO e o prognóstico.

Quadro 8: Sistema de Avaliação Histopatológica de Risco de Brandwein-Gensler et al. (adaptado de Brandwein-Gensler et al., 2010).

Sistema de Avaliação Histopatológica de Risco de Brandwein-Gensler et al.			
Variável histopatológica	Pontuação		
	0	1	2
Invasão perineural	Nenhuma	Pequenos nervos	Grandes nervos
Infiltrado linfocítico	Contínuo	Grandes agregados	Pouco ou nenhum
Pior padrão de invasão	Padrão 1, 2 ou 3	4	5

Quadro 9: Pontuação de risco baseada na soma do total de pontos obtidos pela escala de Brandwein-Gensler et al. (adaptado de Brandwein-Gensler et al., 2010).

Pontuação de risco	Risco de recorrência local	Probabilidade de sobrevida total	Indicação para radioterapia adjuvante
0	Baixo	Boa	Não
1 ou 2	Intermediário	Intermediária	Não
3-9	Alto	Pobre	Sempre

3.8.1.5. Sistema de Graduação Histopatológica do Grau de Malignidade da OMS

A classificação histopatológica do grau de malignidade proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2005 fundamentou-se na classificação de Broder, baseando-se no grau de diferenciação celular, e permitiu o agrupamento do CECO em três categorias: pouco, moderadamente e bem diferenciados (Quadro 10). Os tumores cuja arquitetura se assemelha a um padrão normal de epitélio escamoso são classificados como CEC bem diferenciado. Os tumores pouco diferenciados caracterizam-se pelo predomínio de células imaturas, muito pleomorfismo celular e nuclear, numerosas mitoses (típicas e atípicas), e mínima queratinização. Um tumor que apresente aparência microscópica situada entre estes dois extremos, ou seja, que apresente algum grau de pleomorfismo nuclear, atividade mitótica e pouca queratinização, é considerado um CEC moderadamente diferenciado (Johnson et al., 2005; Lourenço et al., 2007).

Por apresentar apenas três graus de classificação, há uma tendência para que a maioria dos tumores seja classificada no grau intermédio (Lourenço et al., 2007).

Para além disso, a aplicação do sistema de graduação da OMS na prática clínica é controversa e, muitos autores reconhecem que esta classificação histopatológica apresenta uma baixa correlação com a evolução da doença e com a resposta ao tratamento (Heffner, 2002; Woolgar, 2006). Também de acordo com Sawazaki-Calone et al. (2015), este sistema de graduação histopatológica não é adequado para o CECO.

Quadro 10: Sistema de Graduação Histopatológica do Grau de Malignidade da OMS (adaptado de Lourenço et al, 2007).

Graduação Histopatológica da OMS	
Parâmetros	Características
Pouco diferenciados	Predomínio de células imaturas Numerosas mitoses típicas e atípicas Mínima queratinização
Moderadamente diferenciados	Certo grau de pleomorfismo nuclear e atividade mitótica Pouca queratinização
Bem diferenciados	Arquitetura tecidual semelhante ao padrão normal de epitélio escamoso

3.8.1.6. Modelo BD de Almangush et al.

Recentemente, foi proposto um novo sistema de graduação histopatológica, denominado modelo BD: em que “B” (do inglês: *budding*) é referente a ninhos de células tumorais, e “D” (do inglês: *depth of invasion*) corresponde à profundidade de invasão do tumor. O ninho de células tumorais define-se como a presença de células tumorais isoladas ou pequenos agrupamentos com menos de 5 células tumorais na frente invasiva do tumor. A profundidade de invasão é medida desde a superfície do tumor até ao ponto mais profundo de invasão tumoral. Posteriormente, o resultado da análise dos padrões histopatológicos é então classificado em três grupos de pontuações que podem ser de 0, 1 e 2 de acordo com o baixo, médio ou elevado risco, respetivamente (Quadro 11). (Almangush et al., 2014; Almangush et al., 2015).

A profundidade de invasão do tumor tem sido um fator usado na predição do índice de metastização dos linfonodos cervicais e, para além disso, também reflete a agressividade do crescimento do tumor ao alcançar estruturas vasculares e linfáticas. Relativamente ao *tumor budding*, este é representativo de duas características malignas: perda de coesão celular e invasão ativa. O *tumor budding* tem sido apontado como um marcador de prognóstico importante para tumores de outros locais, tais como cólon e o recto, esófago, pulmão, laringe e língua (Sawazaki-Calone et al., 2015). Apesar do papel da transição epitélio-mesenquimal (EMT, do inglês: *Epithelial Mesenchymal Transition*) na migração das células tumorais e na metastização, nenhum dos sistemas de classificação anteriores inclui parâmetros histopatológicos que a tenham em consideração. Como tal, uma vez que o *tumor budding* se correlaciona com o EMT em muitos carcinomas, o modelo BD apresenta esta vantagem relativamente aos outros sistemas de classificação (Almangush et al., 2015). Uma vez que ambos os fatores utilizados neste modelo já demonstraram ser individualmente preditivos do prognóstico em doentes com CECs orais, o objetivo da sua junção foi no fundo potencializar o seu poder de predição (Sawazaki-Calone et al., 2015).

No estudo de Almangush et al. (2014), o modelo BD demonstrou ter uma correlação significativa com a sobrevida dos doentes com CEC da língua em estádios iniciais.

Este modelo tem como principais vantagens ser simples e objetivo, sendo de facto o único sistema que se correlaciona significativamente com a sobrevida global, a sobrevida específica da doença e a sobrevida não associada à doença (Sawazaki-Calone et al., 2015).

Quadro 11: Modelo BD de Almangush et al. (adaptado de Almangush et al., 2015).

Modelo BD de Almangush et al.	
Pontuação	Descrição histológica
0	Tumor com uma profundidade de invasão < 4 mm e < 5 células tumorais na frente invasiva do tumor.
1	O tumor deverá ter apenas uma das seguintes características: Tumor com uma profundidade de invasão ≥ 4 mm e < 5 células tumorais na frente invasiva do tumor, ou Tumor superficial (< 4 mm), mas com ≥ 5 células tumorais na frente invasiva do tumor.
2	Tumor com uma profundidade de invasão ≥ 4 mm e ≥ 5 células tumorais na frente invasiva do tumor.

3.9. Tratamento

De modo geral, os tratamentos padrão atuais para CECO felino (cirurgia, radioterapia, quimioterapia e combinações entre eles) têm resultados fracos, com tempos médios de sobrevivência na ordem de poucos meses. O tratamento apenas é curativo numa pequena percentagem de casos, nos quais o tumor é passível de ser removido cirurgicamente na sua totalidade. A maioria dos gatos apresenta recidiva local mesmo antes da metastização clínica (Bilgic, 2015; Cannon, 2015). Independentemente da terapêutica, a maioria dos gatos são sujeitos a eutanásia devido à progressão local do tumor e consequente gravidade clínica. No geral, o tempo médio de sobrevivência varia entre 2 a 4 meses, com apenas 10% dos gatos a sobreviverem um ano (Wypij, 2013).

3.9.1. Cirurgia

Tal como acontece em medicina humana, a excisão cirúrgica do tumor é a melhor solução terapêutica em gatos com CECO. Contudo, devido à natureza invasiva do tumor e, como a maioria dos animais apresenta um estágio avançado da doença na altura do diagnóstico, o tratamento é normalmente paliativo. Idealmente são necessárias margens superiores a 1cm porém, devido às pequenas dimensões craniofaciais do gato é, muitas vezes, difícil de atingir este objetivo (Wypij, 2013; Bilgic, 2015; Cannon, 2015).

A mandíbula rostral é considerada a região anatómica mais passível de exérese cirúrgica e, quando considerada viável, a mandibulectomia resulta em tempos médios de sobrevivência de 5 a 12 meses (Cannon, 2015). Contudo, de acordo com um estudo de Northrup et al. (2006), foram observadas altas taxas de recorrência em doentes tratados com mandibulectomia. Isto pode ser

atribuído às dificuldades na determinação da extensão da invasão tumoral e na obtenção de margens de tecido normal em todas as direções à volta do tumor (Bilgic, 2015).

As ressecções cirúrgicas radicais podem, no entanto, afetar a capacidade de alimentação. Num estudo retrospectivo de 42 gatos submetidos a mandibulectomia para o tratamento de vários tumores orais, 12% nunca recuperou essa capacidade durante o período de seguimento de 813 dias. Por outro lado, noutros gatos, a cirurgia resultou numa boa qualidade de vida, apesar da presença de ptialismo, protrusão lingual, diminuição da capacidade de preensão e de auto-higienização (Northrup et al., 2006).

3.9.2. Radioterapia

A radioterapia é a modalidade de tratamento primário de tumores não extirpáveis. No entanto a radioterapia, usada isoladamente, não é considerada totalmente eficaz dando origem a tempos médios de sobrevivência de 2 a 5,8 meses (Liptak & Withrow, 2013; Wypij, 2013).

Dois protocolos de radioterapia, a tradicional (frações de 3-4 Gy ao longo de 3-4 semanas até uma dose total de 40-50 Gy) e a paliativa (3 frações de 8 Gy nos dias 0, 7 e 21), já foram estudados não tendo demonstrado eficácia em gatos (Bregazzi et al., 2001; Fidel et al., 2011). Fidel, Sellon, Houston e Wheeler (2007) utilizaram outro protocolo de radiação acelerada (14 frações de 3,5 Gy durante 9 dias), tendo atingido tempos médios de sobrevivência de 86 dias, sem graves efeitos adversos.

O CECO felino é um tumor responsivo à radioterapia, porém é também radiorresistente. Devido à sua rápida taxa de crescimento, o CECO tende a regredir rapidamente e completamente em resposta à radiação. No entanto, alguns subclones são resistentes à radiação e tendem a repovoar rapidamente após o tratamento (Moore, 2010; Bilgic, 2015).

3.9.3. Quimioterapia

A quimioterapia usada isoladamente é considerada ineficaz no controlo do tumor primário (Wypij, 2013). Embora a sua eficácia seja mínima, os fármacos quimioterápicos normalmente utilizados incluem a cisplatina, a mitoxantrona, a doxorrubicina e a ciclofosfamida ou a bleomicina (Fidel et al., 2011). Novos fármacos como cetuximab, gifinitib e o masitinib têm vindo a ser investigados em gatos (Supsavhad, 2015).

3.9.4. Combinações terapêuticas

Num estudo de Hutson, Willauer, Walder, Stone e Klein (1992), a combinação de mandibulectomia com radioterapia resultou em tempos médios de sobrevivência de 14 meses, com uma taxa de sobrevivência a um ano de 57%.

A combinação da radioterapia com sensibilizadores de radiação ou com quimioterapia aumenta as taxas de resposta ao tratamento e os tempos médios de sobrevivência (Liptak & Withrow, 2013).

A gencitabina usada como radiosensibilizadora (25mg/m^2 duas vezes por semana) em combinação com o protocolo de radioterapia paliativa resultou em tempos médios de sobrevivência de 111,5 dias (Jones, Lorimier, Kitchell & Losonsky, 2003).

A quimioterapia adjuvante constitui uma boa opção tanto para o controlo do tumor, como da metastização. O uso de um protocolo que combina radioterapia e quimioterapia com carboplatina resultou em tempos médios de sobrevivência de 163 dias (Fidel et al., 2011). Também a combinação da quimioterapia com mitoxantrona e radioterapia tem mostrado resultados eficazes no tratamento do CECO felino, com tempos médios de sobrevivência de 184 dias (Moore, 2010; Liptak & Withrow, 2013).

Recentemente, um estudo de Wiles et al. (2016) constatou que gatos tratados com fosfato de toracenib (Palladia®) tiveram tempos médios de sobrevivência 2,5 vezes maiores aos não tratados com este inibidor dos recetores tirosina-cinase. Embora a sua sobrevivência a longo prazo tenha permanecido baixa, o benefício clínico e a baixa toxicidade observada sugerem que mais estudos deverão ser feitos acerca do uso do toracenib como agente único e em tratamentos multi-modais.

3.10. Prognóstico

O prognóstico de gatos com CECO é reservado (Bostock, 1972; Cotter, 1981; Bradley, MacEwen & Loar, 1984; Reeves, Turrel & Withrow, 1993; Radlinsky, 2013; Willard, 2014).

De forma geral, a maioria dos gatos com CECO morrem dentro de 6 meses devido à progressão local da massa. Tumores pequenos e localizados rostralmente, retirados cirurgicamente, podem estar associados com tempos de sobrevivência mais longos. O CEC mandibular parece estar associado a um melhor prognóstico (Bradley et al., 2011; Liptak & Withrow, 2013).

Em medicina humana, a presença de metastização nos linfonodos regionais é um importante fator de prognóstico em doentes com CECO, sendo que a taxa de sobrevivência aos 5 anos é de 20-

36% após a cirurgia, comparada com 63-86% em doentes sem metastização dos linfonodos (Shingaki, Suzuki, Nakajima & Kawasaki, 1988).

Em humanos, fatores como a idade e o sexo não mostraram ter qualquer relação com a taxa de sobrevivência (Myoung et al., 2006). De forma semelhante no cão, a idade, o tamanho do tumor e a sua localização primária, não estão associados com o tempo de sobrevivência (Mestrinho, Faísca, Peleteiro & Niza, 2014a). Por outro lado, Lo Muzio et al. (2007) concluíram que, a graduação (de acordo com o sistema da OMS), o tamanho do tumor e a recorrência são bons preditores do prognóstico. Quanto mais alto o valor de T, menor a taxa de sobrevivência total (Myoung et al., 2006).

O CECO é localmente invasivo, tanto em humanos como em gatos, sendo frequentemente diagnosticado tardiamente. Nos gatos, o crescimento do tumor primário é muitas vezes o fator limitante, embora as metástases sejam menos comuns que nos humanos, isto pode dever-se ao estágio avançado encontrado no momento do diagnóstico, assim como à fraca resposta a terapias locais, que fazem com que os tempos de sobrevivência médios sejam muito curtos (Cannon, 2015).

3.11. Marcadores moleculares no carcinoma espinocelular oral: do gato ao homem

Até há pouco tempo, a presença de metástases nos linfonodos regionais era o único indicador de prognóstico com significado no CECO (Bockmühl, Schlüns, Küchler, Petersen & Petersen, 2000). Contudo, a incidência de metastização depende do grau de diferenciação celular, do grau de invasão e da localização do tumor primário. Uma vez que, tendo apenas em consideração parâmetros histopatológicos, é difícil de prever o comportamento biológico deste tipo de tumor, tornou-se necessário descobrir marcadores biológicos que permitissem estabelecer um consenso entre a clínica e o diagnóstico histopatológico (Lo Muzio et al., 2005; de Sousa et al., 2009).

Recentemente, técnicas como a imunohistoquímica e a biologia molecular têm permitido avaliar a expressão de proteínas relacionadas com a regulação do ciclo celular. As alterações da expressão e, conseqüentemente, da função dessas proteínas poderão representar um forte indicador do potencial maligno de uma lesão. Hoje em dia, sabe-se que as alterações nos mecanismos de proliferação e apoptose celular são essenciais para a carcinogénese. Entre as várias proteínas envolvidas nestes processos, o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), e a proteína p63 são proteínas que merecem maior destaque, uma vez que participam no processo de carcinogénese oral em humanos (Bockmühl et al., 2000; de Sousa et al., 2009), possuindo um potencial valor prognóstico para o gato, à semelhança do homem.

3.11.1. PCNA

O Ki-67 e o PCNA são marcadores de proliferação celular que têm sido considerados importantes ferramentas para uma avaliação fácil e rápida da proporção de células em proliferação num tumor. O PCNA apresenta maior marcação do que o Ki-67, o que pode ser explicado pelo facto de ter um tempo de semi-vida mais longo do que o Ki-67, podendo mesmo ser detetado em células que tenham deixado recentemente o ciclo celular. Além disso, a expressão de PCNA pode também ser induzida por agentes danificadores do DNA. O Ki-67, ao ter um tempo de semi-vida muito mais curto do que o PCNA, faz com que a sua expressão represente unicamente a fase proliferativa das células, não se acumulando nas células como o PCNA. E, ao contrário do PCNA, não está envolvido na reparação do ADN (Allison & Best, 1998; Krecicki et al., 1999; Myoung et al., 2006).

O PCNA é uma proteína nuclear não-histona, com um peso molecular de 36-kDa, composto por três cadeias proteicas idênticas (homotrímero) em forma de anel, codificadas por uma sequência genómica localizada no cromossoma A3 do gato (Genebank, Gene ID: 101080704).

O PCNA, uma proteína auxiliar do ADN-polimerase δ , aparece no núcleo durante a fase G1 tardia, atinge um máximo na fase S e diminui ao longo da fase G2 e M sendo, portanto, utilizado como um marcador de proliferação (Madewell, 2001; Chiang et al., 2000; Keshav & Narayanappa, 2015). O PCNA desempenha um papel importante na replicação de ADN, na remodelação de cromatina, na reparação de ADN e no controlo do ciclo celular (Chiang et al., 2000; Stoimenov & Helleday, 2009; Kato et al., 2011).

Esta proteína pode dividir-se em dois grupos de acordo com a sua função, sendo que um deles está firmemente associado à cromatina e é capaz de participar no processo de replicação de ADN, enquanto que o outro não está associado à cromatina e não participa na síntese de ADN. Uma vez que ainda não existem ferramentas de diagnóstico capazes de fazer a distinção entre estes dois grupos por vezes, há resultados discrepantes no que respeita à correlação entre a expressão do PCNA e o prognóstico dos doentes. Contudo, para além da utilização do PCNA como marcador de proliferação, a sua inibição também tem sido considerada como uma potencial estratégia anticancerígena, dada a função desta proteína no crescimento tumoral e a existência de uma isoforma ácida que é exclusivamente expressa nas células tumorais, não aparecendo nas células normais (Wang, 2014). O PCNA é talvez o marcador do índice de proliferação mais utilizado, sendo capaz de monitorizar a maior parte das fases do ciclo celular, sendo que o seu padrão de

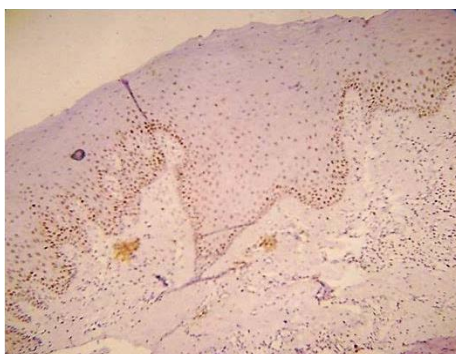
marcação permite ainda fazer alguma distinção das mesmas (Iatropoulos & Williams, 1996; Madewell, 2001).

Alterações funcionais na atividade do PCNA são eventos genéticos comuns em vários tipos de tumores, tendo-se descoberto ser um marcador de proliferação celular eficaz, que pode ser utilizado na previsão do grau histológico, da taxa de recorrência e do prognóstico de doentes com CECO (Franchi, Gallo, Boddi & Santucci, 1996; Staibano et al., 1998). A expressão de PCNA também tem sido considerada um indicador de prognóstico útil em carcinomas gástricos, hepáticos e colorretais (Chiang et al., 2000). A sua expressão ainda não foi avaliada no CECO felino.

3.11.1.1.1. Expressão do PCNA

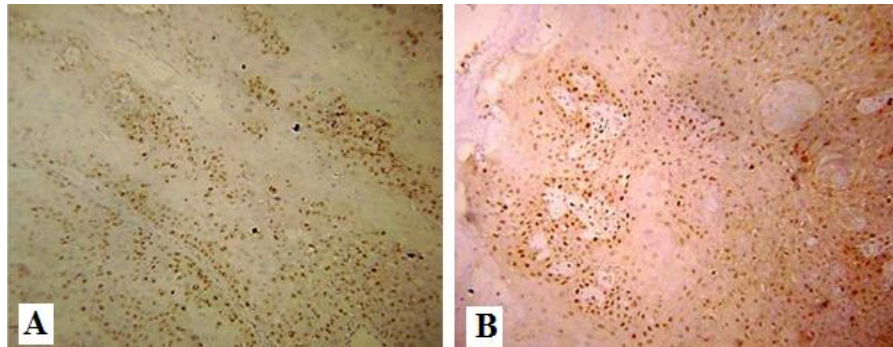
No epitélio da mucosa oral normal, a marcação para o PCNA verificou-se apenas ao nível da camada basal (Figura 5) (Poosarla et al., 2015).

Figura 5: Detecção imunohistoquímica de PCNA na mucosa oral normal de humano (ampliação x10) (adaptado de Poosarla et al., 2015).



Relativamente aos diferentes graus de CECO, estes mostraram um padrão de marcação ao longo de todo o epitélio e ainda uma marcação intensa de células neoplásicas no interior do estroma. Em carcinomas bem diferenciados o PCNA marcou células localizadas à periferia das ilhotas tumorais, enquanto que as células queratinizadas centrais foram, geralmente, negativas. Em carcinomas menos diferenciados, a coloração foi heterogénea (Figura 6) (Krecicki et al., 1999; Poosarla et al., 2015). No cão, à semelhança do que se verificou em humanos, a expressão de PCNA manifestou-se ao longo de todo o tumor, sendo mais concentrado nas camadas basais das ilhotas tumorais (Mestrinho et al., 2014a).

Figura 6: Detecção imunohistoquímica do PCNA nos diferentes graus de CECO humano (adaptado de Poosarla et al., 2015).



Legenda: (A) CECO bem diferenciado com marcação do PCNA à periferia das ilhotas tumorais. (B) CECO pouco diferenciado com elevada marcação imunohistoquímica do PCNA (ampliação x10).

Kato et al. (2011) e Myoung et al. (2006) estudaram as características clinicopatológicas como a idade, sexo, localização primária do tumor, classificação N e a diferenciação celular, não havendo uma correlação significativa com a expressão de PCNA. A classificação T e a expressão do PCNA estão significativamente correlacionadas (Kato et al., 2011). Atualmente, sabe-se que, a metastização dos linfonodos é um indicador de prognóstico fiável na previsão do prognóstico em doentes com CECO, estando relacionada com uma taxa de sobrevivência baixa. Como tal, a marcação imunohistoquímica do PCNA pode ser um marcador de prognóstico útil, uma vez que o nível de expressão do PCNA observado no tumor primário é significativamente mais elevado nos doentes com metastização de linfonodos em comparação com aqueles sem metástases (Myoung et al., 2006). Um estudo elaborado por Keum et al. (2006) e Kato et al. (2011), revelou que a expressão do PCNA nos CECO não permitiu prever significativamente o índice de metastização dos linfonodos.

O índice de expressão do PCNA pode ser utilizado para avaliar a proliferação e agressividade dos diferentes graus de CECs orais (Poosarla et al., 2015). De acordo com Kato et al. (2011), os resultados do seu estudo sugerem que CECs orais altamente invasivos exibem atividade do PCNA, aumentando assim a capacidade proliferativa das suas margens invasivas. Assim, é mais provável que haja recorrência nesses tumores, tendo também sido verificada uma associação estatisticamente significativa entre a expressão de PCNA e a taxa de recorrência do tumor, indicando portanto um pior prognóstico.

Existe uma correlação positiva entre a expressão de PCNA e o grau histológico do CECO, traduzindo-se por uma maior expressão de PCNA nos tumores menos diferenciados (Störkel et

al., 1993; Staibano et al., 1998; Krecicki et al., 1999; Kato et al., 2011; Poosarla et al., 2015). Uma possível explicação para a relação encontrada entre a graduação histopatológica e a contagem de PCNA pode basear-se no facto da proliferação celular ser um dos fatores considerados no grau de malignidade histopatológico (Krecicki et al., 1999).

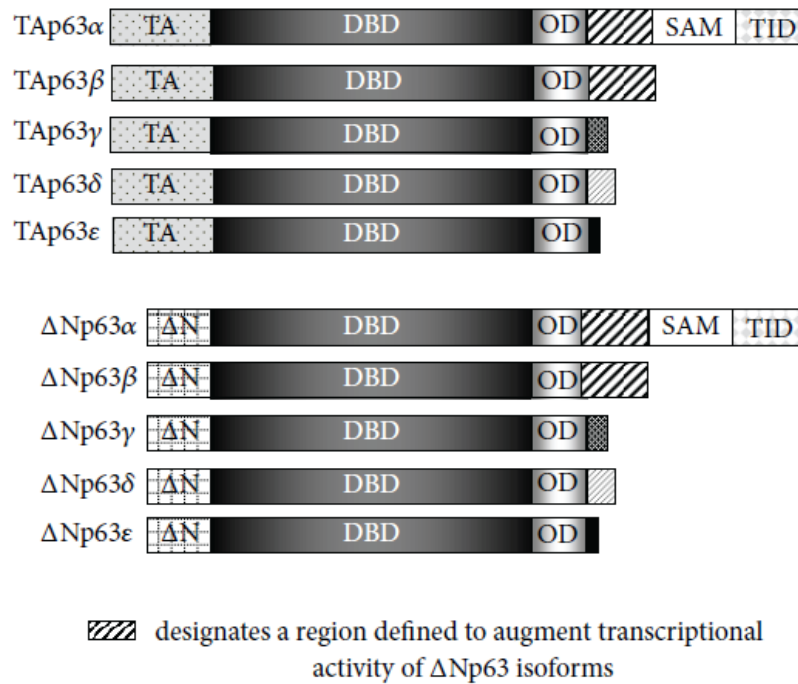
Elevadas expressões de PCNA têm piores prognósticos (Störkel et al., 1993; Staibano et al., 1998; Kato et al., 2011). O mesmo foi verificado no CECO canino (Mestrinho et al., 2014a). Por outro lado, embora inesperado, de acordo com Myoung et al. (2006), a marcação do PCNA não mostrou ter uma relação significativa com a sobrevivência.

3.11.2. p63

O gene TP63, um homólogo do gene TP53, está localizado no cromossoma C2 do gato (Genebank, Gene ID: 101095124). Os membros da família da proteína p53 que, para além do p63 também inclui o p73, compartilham entre si três domínios funcionais: o domínio de transativação (TA), o domínio de ligação ao ADN (DBD, do inglês: *DNA Binding Domain*), e o domínio de oligomerização (OD, do inglês: *Oligomerization Domain*) (Yang et al., 1998).

O p63 é responsável pela transcrição de dois grupos de proteínas p63, TA e ΔN . (Bortoluzzi, Yurgel, Dekker, Jordan, & Regezi, 2004; Mangiulli et al., 2009; Varun, Ranganathan, Rao & Joshua, 2013; King, Ha, Camilli, & Weinberg, 2013). O grupo TAp63 contém o domínio de TA N-terminal com homologia e função similar ao p53 sendo, como tal, capaz de induzir a apoptose e o bloqueio celular (Yang et al., 1998; Moll et al., 2001; Bortoluzzi et al., 2004). Por outro lado, o grupo $\Delta Np63$ é destituído deste domínio e é capaz de bloquear os genes ativados pelo p53 e pelas proteínas TAp63 e TAp73, o que leva à proliferação celular (Yang et al., 1998; Dohn, Zhang & Chen, 2001; Bortoluzzi et al., 2004; Varum et al., 2013). Todas as isoformas do TAp63 e $\Delta Np63$ contêm os domínios DBD e OD contudo, diferem na sua extremidade C-terminal que, ao ser sujeita a *splicings* alternativos, pode omitir um ou vários exões dando origem a 3 isoformas para cada uma das suas classes de proteínas codificadas (TAp63 α , TAp63 β , TAp63 γ , e $\Delta Np63\alpha$, $\Delta Np63\beta$, $\Delta Np63\gamma$,) (Yang et al., 1998; Moll et al., 2001; King et al., 2013). Recentemente, outras 2 isoformas foram descritas por Mangiulli et al. (2009), sendo denominadas TAp63 δ , TAp63 ϵ e $\Delta Np63\delta$, $\Delta Np63\epsilon$ (Figura 7).

Figura 7: Isoformas do p63.



O p63 é essencial ao desenvolvimento de estruturas epiteliais estratificadas como a mucosa oral, pele, dentes e glândulas salivares (Yang et al., 1999). A manutenção da normal homeostase da epiderme envolve processos de mediação, tais como a proliferação, diferenciação, manutenção das células-tronco, senescência, viabilidade e a adesão de células. A expressão do p63 parece estar envolvida em cada um destes processos (King et al., 2013). Uma vez que a proteína p63 é necessária ao desenvolvimento e manutenção das células progenitoras dos epitélios estratificados, animais *knockout* sem o gene p63, apresentam alterações de desenvolvimento, como a ausência total de epitélio estratificado e dos seus derivados, incluindo a epiderme, glândulas mamárias e próstata. (França, Dedivitis, Sementili, Martins & Pfuetzenreiter, 2007).

Enquanto que, em relação ao gene p53, mutações no mesmo são a anomalia genética mais comum encontrada em 40-50% dos CECs orais humanos (Varun et al., 2013), a mutação do p63 raramente ocorre em células de linha cancerígena (Hagiwara, McMenamin, Miura & Harris, 1999). Contudo, o que se verifica é que ocorre uma sobre-expressão da proteína e/ou do mRNA do p63 em CECs de diferentes órgãos, como na cavidade oral, laringe, pulmão, colo uterino e em carcinomas de células de transição da bexiga, causada por uma amplificação do gene, que desempenha um papel importante na oncogénese dos mesmos (Bortoluzzi et al., 2004; Foschini et al., 2004; Varun et al., 2013). Tendo em conta a dupla função do p63, como agente proliferativo

com as suas isoformas ΔN e agente anti-proliferativo com as suas isoformas TA, vários autores apoiam a hipótese que uma desregulação da transcrição do gene p63 pode estar implicada na génese do tumor, favorecendo a capacidade proliferativa das células neoplásicas (Foschini et al., 2004).

Recentemente, tem havido um interesse acrescido no estudo do p63 devido a inúmeros fatores que sugerem o seu papel oncogénico na regulação da proliferação e diferenciação em lesões pré-malignas e malignas de origem epitelial, tais como:

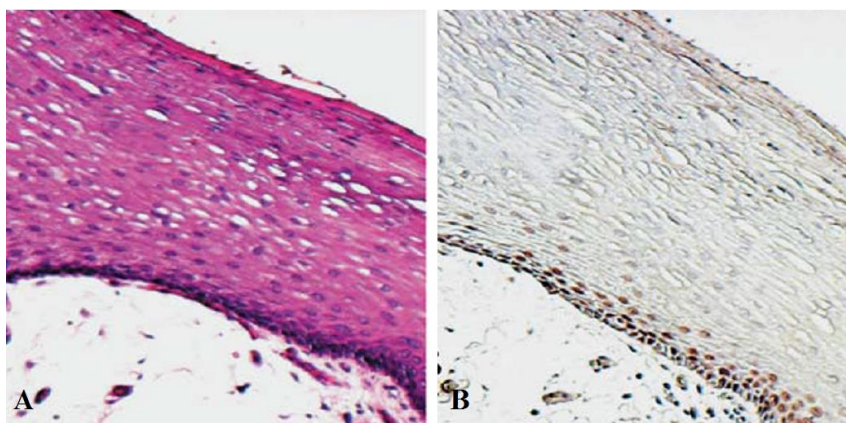
- (1) a sua expressão ser praticamente restrita às células epiteliais;
- (2) a sua mutação ser pouco frequente;
- (3) a sua sobre-expressão já ter sido relatada em vários tumores sólidos (Lo Muzio et al., 2005).

Devido à existência de poucos estudos acerca do p63, a sua função exata no que diz respeito ao desenvolvimento e progressão do CECO permanece ainda desconhecida. Além disso, há também muito poucas publicações que relacionem a técnica de imunohistoquímica do p63 com o prognóstico dos doentes com CECO (Oliveira et al., 2008). De acordo com Lauxen, Oliveira, Rados, Lingen, Nor e Sant'Ana Filho (2014), o p63 ao desempenhar um papel importante no desenvolvimento e manutenção do CECO, faz com que seja um alvo atrativo no tratamento de doentes nesta condição.

3.11.2.1.1. Expressão do p63

O epitélio normal oral humano apresenta expressão de células p63-positivas a nível da camada basal e parabasal (Figura 8). A marcação manifesta-se apenas a nível nuclear, com uma elevada intensidade de marcação, sendo esta mais forte na camada basal do que na camada parabasal. De modo geral, os queratinócitos da camada suprabasal não marcam pelo anticorpo anti-p63, verificando-se apenas uma ligeira expressão em algumas áreas. No epitélio normal, as células p63-positivas nunca excederam 10% dos queratinócitos (Parsa, Yang, McKeon & Green, 1999; Choi, Batsakis, Zhan, Sturgis, Luna & EL-Naggar, 2002; Foschini et al., 2004; Lo Muzio et al., 2007; Re et al., 2014).

Figura 8: Mucosa oral normal em humano (adaptado de Foschini et al., 2004).



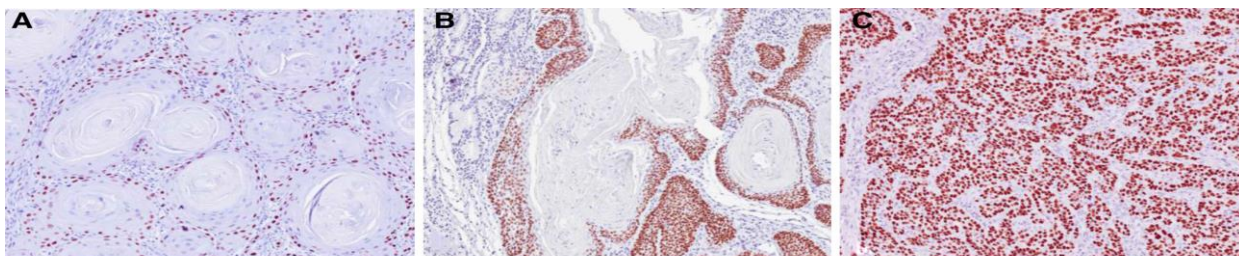
Legenda: (A) Mucosa oral normal corada com H&E. (B) Mucosa oral normal com marcação do p63 nos queratinócitos a nível das camadas basal e suprabasal.

Nos CECs orais, vários padrões de marcação para o p63 podem ser observados de acordo com o grau do tumor (Figura 9). O CECO bem diferenciado apresenta um padrão semelhante ao do epitélio normal (camadas basal e parabasal), com uma percentagem de células p63-positivas a variar entre 10 e 30%. De acordo com Chu et al. (2002), nas áreas tumorais bem diferenciadas, o p63 expressa-se sobretudo nas células à periferia dos ninhos tumorais, estando geralmente ausente nas células diferenciadas centrais (Figura 10). Nos CECs orais moderadamente diferenciados, a marcação é mais difusa e é também observada a nível da camada suprabasal. A maioria destes tumores teve uma percentagem de células marcadas superior a 30%. Relativamente aos CECs pouco diferenciado, podem ser vistos dois padrões (Chen, Huse & Lin, 2004; Lo Muzio et al., 2005):

- (1) pouca ou nenhuma marcação do p63 nos tumores completamente indiferenciados;
- (2) marcação difusa e intensa, com mais de 50% das células marcadas, nos tumores infiltrativos. O p63 não foi detetado nas pérolas de queratina (Figura 10).

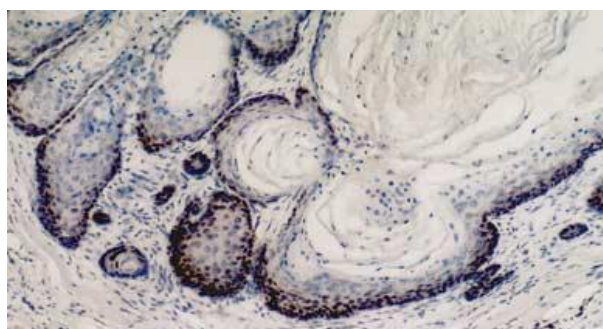
De acordo com vários autores, o número de células p63-positivas é substancialmente maior no CECO do que na mucosa oral normal (Bortoluzzi et al., 2004; Foschini et al., 2004; Lo Muzio et al., 2005; Oliveira et al., 2008; Varun et al., 2013; Sinha, Chandra, Zaidi, Saxena & Dwivedi, 2015). Assim, a sobre-expressão do p63 e, sobretudo, a sua presença na camada suprabasal, parece ser um indicador da capacidade do CEC proliferar e permanecer pouco diferenciado (Lo Muzio et al., 2007).

Figura 9: Detecção imunohistoquímica do p63 nos diferentes graus de CECO humano (adaptado de Re et al., 2014).



Legenda: (A) CECO bem diferenciado com presença de pérolas de queratina e com marcação do p63 nas células da camada basal. (B) CECO moderadamente diferenciado com expressão difusa do p63. (C) CECO pouco diferenciado com elevada marcação imunohistoquímica do p63 (ampliação x10).

Figura 10: Imunoreatividade negativa do p63 em pérolas de queratina no CECO humano e marcação de células localizadas na periferia das ilhotas tumorais (coloração ABC, ampliação x100) (adaptado de Chen et al., 2004).



Não foi encontrada qualquer correlação estatisticamente significativa entre a expressão do p63 e características clinicopatológicas como o sexo, a idade, o tamanho do tumor, a localização primária do tumor, o estadiamento TNM e a taxa de recorrência (Lo Muzio et al., 2005; Moergel, Abt, Stockinger & Kunkel, 2010; Lauxen et al., 2014). De acordo com Re et al. (2014), a sobre-expressão do p63 no CECO esteve relacionada com a presença de metástases em linfonodos. Contrariamente, de acordo com Lo Muzio et al. (2005) e Moergel et al. (2010) esta relação não se verificou. Segundo Lo Muzio et al. (2005), houve uma correlação positiva estatisticamente significativa entre a percentagem de células positivas para o p63 e a infiltração perineural.

Embora seja observada marcação imunohistoquímica para o p63 em todos os casos de CECO observados, alguns autores concluíram que a percentagem de células que expressam o p63 é significativamente menor em CECs orais bem diferenciados do que nos pouco diferenciados, o que significa que a expressão do p63 está inversamente associada ao grau histológico do CECO (Foschini et al., 2004; Lo Muzio et al., 2005; Lo Muzio et al., 2007; Re et al., 2014). Assim, a

marcação de p63 por imunohistoquímica poderá ser considerada uma ferramenta útil para usar em associação com a classificação histológica na avaliação do grau de diferenciação dos CECs orais (Lo Muzio et al., 2005). Pelo contrário, França et al. (2007), Moergel et al. (2010) e Lauxen et al. (2014) concluíram que, não existe qualquer correlação entre a marcação para o p63 e o grau histológico.

A sobre-expressão do p63 mostrou ter uma associação significativa com piores prognósticos (Lo Muzio et al., 2005; Lo Muzio et al., 2007; Moergel et al., 2010; Loljung et al., 2014, Re et al., 2014). Contrariamente, vários outros autores demonstraram que uma sobre-expressão do p63 está correlacionada com um melhor prognóstico tanto no CECO (Oliveira et al., 2008), como no de outras localizações anatómicas como da bexiga, pulmão e esófago (Koga et al., 2003; Massion et al., 2003; Takahashi, Noguchi, Takeno, Kimura, Okubo & Kawahara., 2006). Outros autores verificaram ainda, que não existe qualquer associação significativa entre os dois fatores (Choi et al., 2002; De Oliveira, Ribeiro-Silva & Zucoloto, 2007). Foschini et al. (2004), sugeriram que a falta de relação entre a marcação imunohistoquímica para o p63 e o prognóstico poderia ser devida ao facto do anticorpo usado contra o p63 não ser capaz de discriminar as diferentes isoformas do mesmo. Pruneri et al. (2002), concluíram que uma baixa expressão do grupo de proteínas TAp63 favorece o comportamento agressivo do CECO. Nylander, Coares e Hall (2000) e Foschini et al. (2004) relataram uma sobre-expressão de Δ Np63 ou mesmo a sua expressão isolada deste grupo de proteínas no CECO, o que sugere que este grupo de proteínas desempenha um papel oncogénico na mucosa oral. Posto isto, Lo Muzio et al. (2005) consideram que a razão mais provável quando se verifica que uma maior marcação do p63 estar correlacionada com um pior prognóstico, é essa marcação corresponder às isoformas Δ Np63 e, defendem que a falta de correlação encontrada noutros estudos provavelmente se deve ao baixo número de casos examinados e não ao anticorpo usado.

A maioria dos estudos apenas avalia a quantidade de células marcadas pelo p63, sem ter em conta a intensidade de marcação (Lo Muzio et al., 2005; Choi et al., 2002). Todavia, num estudo realizado por De Oliveira et al. (2007), concluiu-se que uma elevada intensidade de marcação está associada a um bom prognóstico, embora nenhuma correlação tenha sido encontrada em relação à recorrência (Loljung et al., 2014) e à metastização. A mesma conclusão já tinha sido descrita por Massion et al. (2003), no que diz respeito ao carcinoma escamoso do pulmão, no qual um maior tempo de sobrevivência estava associado a uma forte intensidade de marcação.

III – Aspetos clinicopatológicos e marcação imunohistoquímica para o PCNA e p63 no carcinoma espinocelular oral felino

1. Objetivos do trabalho experimental

O presente trabalho tem como objetivo principal contribuir para o estudo do CECO felino, principalmente ao nível dos seus eventos moleculares e na sua diferenciação, procurando verificar se estes fatores poderão ser uma ferramenta importante no diagnóstico, tratamento e prognóstico desta doença. De forma a atingir este objetivo, foram definidas as seguintes etapas:

- (1) Avaliar a relação existente entre as características clinicopatológicas (idade, sexo, localização primária do tumor, classificação T, classificação N, estágio tumoral, Sistema de Graduação Histopatológica da Malignidade da OMS, Sistema de Graduação Histopatológica de Broder, Sistema de Graduação Histopatológica Multifatorial de Anneroth et al. e Sistema de Graduação das Margens Invasivas de Bryne et al.) e os índices de marcação do PCNA e do p63, com o prognóstico baseado no tempo de sobrevivência de 20 gatos com CECO.
- (2) Avaliar se os sistemas de classificação histopatológica apresentam alguma correlação com o prognóstico desta doença e, caso esta se verifique, concluir qual é o que apresenta maior valor preditivo.
- (3) Avaliar a relação existente entre as características clinicopatológicas já referidas e o índice de marcação de PCNA e de p63 dos 20 gatos com CECO.
- (4) Avaliar se existe alguma correlação entre o índice de marcação de p63 e a sua intensidade de marcação.
- (5) Avaliar se existe alguma correlação entre os índices de marcação do PCNA e do p63.
- (6) Avaliar o padrão da marcação do PCNA e do p63 nos diferentes graus de CECO felino.

2. Material e métodos

2.1. Amostra em estudo

No presente estudo, foram incluídos vinte casos de CECs orais em gatos provenientes de arquivo, ocorridos no período compreendido entre 2008-2016, cuja amostra biológica se encontrava conservada em bloco de parafina.

Foram recolhidos e registados os dados referentes a: identificação dos animais, raça, sexo, idade, localização do tumor, recorrência tumoral, estadiamento TNM, data de diagnóstico, data de óbito e causa de morte. Em todos os casos foi feito o diagnóstico histopatológico de acordo com os sistemas de gradação histopatológica da OMS, de Broder, de Anneroth et al. e de Bryne et al. O estadiamento TNM foi adaptado de Owen (1980), sendo classificados os valores de T e de N. Relativamente ao tamanho do tumor, embora a classificação T apresente subclassificações, para efeitos do estudo apenas se consideraram as classificações de T1, T2 e T3 de modo a aumentar o tamanho da amostra por categoria. Em relação aos grupos de estadiamento (Quadro 2), estes não foram adicionalmente classificados pois coincidem com os valores de T, devido à inexistência de casos N2b e/ou N3 ou com metastização à distância, o que faz com que o estágio seja independente do valor de N. Assim, os grupos de estadiamento dependem apenas do valor de T obtido pelo que, um valor de T igual a 1, 2 ou 3 corresponde a um estágio I, II ou III, respetivamente.

Em todos os vinte casos de CECO foram realizados estudos de imunohistoquímica recorrendo aos marcadores PCNA e p63, sendo os dados referentes à percentagem de células marcadas e à intensidade de marcação (apenas para o p63) em cada caso registados e analisados.

2.2. Processamento das amostras para os estudos de imunohistoquímica

A técnica de imunohistoquímica foi realizada na sua totalidade no LAP-FMV-UL. A recolha e a fixação do material foram feitas por vários CAMVs, seguindo-se o seu processamento no laboratório acima referido. Em todos os casos, o material enviado para o laboratório correspondeu a carcinomas espinocelulares orais de gato obtidos por excisão cirúrgica. Procedeu-se à elaboração de cortes histológicos dos blocos de parafina com micrótomo rotativo LEICA RM 2135[®] com cerca de 3 µm de espessura e posterior coloração com hematoxilina e eosina (H&E). Para proceder à técnica de imunohistoquímica, os cortes foram colocados em lâminas adesivadas *Superfrost Plus*[®] da *Thermo Scientific*.

2.3. Diagnóstico e exame histopatológico

As amostras foram avaliadas e classificadas de acordo com quatro sistemas de classificação histopatológica:

- (1) Sistema de Graduação Histopatológica do Grau de Malignidade da OMS;
- (2) Sistema de Graduação Histopatológica de Broder;
- (3) Sistema de Graduação Histopatológica Multifatorial de Anneroth et al.
- (4) Sistema de Graduação das Margens Invasivas de Bryne et al.

2.4. Técnica de imunohistoquímica

2.4.1. Seleção de amostras para imunohistoquímica

Do total dos vinte casos estudados, todos eles foram selecionados para a realização da técnica de imunohistoquímica.

2.4.2. Anticorpos utilizados

Os anticorpos disponíveis no mercado são, normalmente, os usados nos exames de rotina da espécie humana, podendo apresentar reatividade cruzada com as espécies canina e felina. Para a imunohistoquímica foram testados dois anticorpos primários, PCNA e p63, para os quais foi conseguida marcação positiva (Quadro 12).

Quadro 12: Anticorpos primário utilizados.

Especificidade do Anticorpo Primário	Origem	Clone	Referência	Isotipo	Esp. Produtoras
PCNA	Dako	PC10	M 0879	IgG2a, kappa	Monoclonal rato
p63	Novocastra™	7 JUL	NCL-L-p63	IG1, Kappa	Monoclonal rato

Quadro 13: Protocolo usado para recuperação antigénica e diluição dos anticorpos.

Especificidade do Anticorpo Primário	Técnica de Recuperação Antigénica	Meio e Tempo da Recuperação Antigénica	Diluição dos Anticorpos Primários
PCNA	Microondas	Tampão EDTA 9.0 a ph = 8.0 5 min a 900W 15 min a 600W	1:700
p63	Microondas	Tampão EDTA 9.0 a ph = 8.0 5 min a 900W 15 min a 600W	1:25

2.4.3. Controlos positivo e negativo

Como controlos positivos para a marcação do PCNA recorreu-se a uma amígdala humana e a uma amígdala de gato.

Como controlo positivo para a marcação do p63, foram usados os queratinócitos normais epiteliais presentes na camada basal, uma vez que esta proteína se encontra presente nestas células (controlo positivo interno).

O controlo negativo foi obtido por substituição do anticorpo primário por PBS.

2.4.4. Protocolo utilizado

Foi realizado um protocolo padrão para ambas as imunomarcações.

1. Desparafinação em xilol (durante 25 minutos).
2. Reidratação dos cortes por incubação das lâminas em tinas com concentrações decrescentes de álcool, de acordo com o seguinte procedimento:
 - Álcool etílico absoluto (duas vezes, durante 5 minutos cada).
 - Álcool etílico 95° (durante 5 minutos).
 - Álcool etílico 70° (durante 5 minutos).
 - Água destilada (durante 5 minutos).
3. Recuperação antigénica realizada em tampão EDTA com pH 9.0, em micro-ondas, durante 5 minutos a 900W, seguidos de 15 minutos a 600W (Quadro 13).
4. Arrefecimento gradual à temperatura ambiente (durante 30 minutos).
5. Lavagem em água destilada (durante 5 minutos).
6. Delimitação dos cortes com caneta hidrofóbica Novocastra™ *Reagent Novopen* (Leica Biosystems).

7. Bloqueio da peroxidase endógena efetuado com a solução Novocastra™ *Peroxidase Block* (Leica Biosystems – RE7157) (durante 10 minutos, à temperatura ambiente).
8. Lavagem com o tampão de lavagem PBS (tampão fosfato-salino) com pH compreendido entre 7.2 e 7.4 (durante 5 minutos).
9. Bloqueio de proteínas com a solução *Blocking Reagent* (Millipore – Detection Kit Det-HP1000) (durante 10 minutos, à temperatura ambiente).
10. Lavagem em PBS (durante 5 minutos).
11. Incubação das lâminas com os anticorpos primários, em concentrações variáveis, de acordo com as especificações constantes no Quadro 13 (durante 30 minutos). Neste estudo, os 2 anticorpos utilizados, anti-PCNA e anti-p63, sofreram diluição com a solução *Bond Primary Antibody Diluente* (Leica Biosystems - AR9352).
12. Lavagem em PBS (duas vezes, durante 5 minutos cada).
13. Incubação dos tecidos com o anticorpo secundário *Biotinylated Secondary Antibodies* (Millipore – Detection Kit Det-HP1000), durante 20 minutos à temperatura ambiente.
14. Lavagem com o PBS (durante 5 minutos).
15. Aplicação de *Streptavidin HRP* (Millipore – Detection Kit Det-HP1000), durante 20 minutos à temperatura ambiente.
16. Aplicação de uma solução cromogénica de diaminobenzidina (DAB) na diluição de 1:20, a Novocastra™ *DAB Chromogen* (Leica Biosystems – RE7162), durante 5 minutos.
17. Lavagem das lâminas em água destilada e contrastadas com Hematoxilina de Mayer.
18. Desidratação dos cortes através da passagem das lâminas por tinas com concentrações crescentes de etanol finalizando em duas imersão em xilol.
19. Montagem dos cortes com resina sintética (Entellan®).

2.4.5. Avaliação da marcação imunohistoquímica do PCNA e do p63

A contagem das células neoplásicas marcadas pelos anticorpos anti-PCNA e anti-p63 foi efetuada a partir de fotografias digitais (ampliação x400) obtidas através da utilização da câmara digital Olympus DP21 *Digital Camera* e do microscópio ótico Olympus BX-51. O *software* de contagem usado foi o ImageJ 1.47v®.

O índice de marcação, determinado através da contagem total de 1000 células neoplásicas (positivas e negativas) observadas em campos distintos obtidos aleatoriamente, corresponde à razão entre o número de células neoplásicas positivas e o número total das células neoplásicas. O

número de campos necessários para atingir essa contagem variou entre 4 a 8. As células que não se apresentavam na sua totalidade no interior da fotografia não foram contabilizadas. A contagem foi feita apenas pela autora de forma a uniformizar a técnica.

No caso particular do p63, a intensidade de marcação foi estimada semi-quantitativamente da seguinte forma: discreta = +; moderada = ++; intensa = +++; muito intensa = ++++.

2.5. Análise estatística

Para a realização da análise estatística procedeu-se ao uso de dois *softwares*: *Microsoft Office Excel* ® 2016 e R 3.3.1 for *Windows* (64-bit).

A idade dos doentes (<10 ou ≥10 anos), o sexo, a localização do tumor primário, a classificação T, a classificação N, o Sistema de Gradação Histopatológica do Grau de Malignidade da OMS, o Sistema de Gradação Histopatológica de Broder, o Sistema de Gradação Histopatológica Multifatorial de Anneroth et al. e o Sistema de Gradação das Margens Invasivas de Bryne et al. foram relacionados com os índices de marcação do p63 e do PCNA e, todos estes, foram também relacionados com o prognóstico baseado no tempo de sobrevivência.

Inicialmente, de modo a avaliar o pressuposto de normalidade foi feito o teste de *Shapiro-Wilk*. Quando essa normalidade foi verificada, o teste *t* de *student* e o teste ANOVA de um fator foram os testes usados para comparar as médias dos grupos. Contrariamente, quando se verificou violação do pressuposto de normalidade, foram usados os testes de *Wilcoxon* e de *Kruskal-Wallis*. O teste de *Tukey* também foi utilizado por ser um complemento à ANOVA que visa identificar quais as médias que, tomadas duas a duas, diferem significativamente entre si.

A intensidade e o sentido da relação entre a percentagem de células positivas para o p63 e a intensidade de marcação do p63, e entre a percentagem de células positivas para o p63 e a percentagem de células positivas para o PCNA, foram avaliadas através do coeficiente de correlação de *Spearman*.

A curva ROC foi empregue de forma a decidir pelo *cutoff* do índice de marcação de PCNA e de p63 que integra o melhor compromisso entre a sensibilidade e a especificidade, ou seja, quando estas estão o mais elevadas possível. Por fim, tendo em conta esse valor bem como as variáveis atrás referidas, foram determinadas as curvas de sobrevivência pelo método de *Kaplan-Meier* de modo a calcular as probabilidades cumulativas de sobrevivência em cada unidade de tempo, seguindo-se o teste do *logrank* para comparação entre as curvas de sobrevivência.

Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

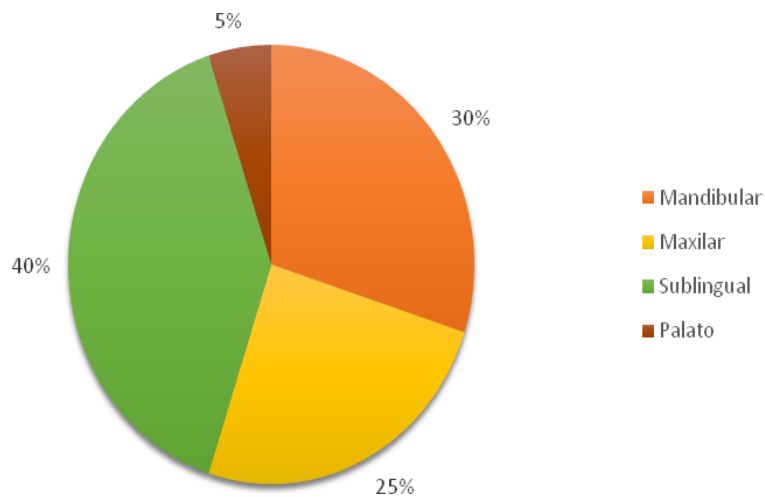
3. Resultados

3.1. Caracterização clinicopatológica da população

A amostra estudada dos 20 felinos incluiu apenas gatos domésticos de pelo curto, sendo 55% (n = 11) machos e os restantes 45% (n = 9) fêmeas. A média de idades da amostra foi de 13.5 ± 3.14 anos, com o intervalo a variar entre os 9 e os 20 anos. Para o estudo em causa foram considerados dois grupos para a variável idade, <10 (10%, n = 2) e ≥ 10 anos (90%, n = 18).

A localização primária do CECO felino foi a seguinte: 40% das lesões (n = 8) na zona sublingual, 30% (n = 6) na mandíbula, 25% (n = 5) na maxila e as restantes 5% (n = 1) no palato (Gráfico 2).

Gráfico 2: Frequência relativa da distribuição da localização primária do CECO felino.



A sobrevivência foi definida como o período, em dias, decorrido entre a data de diagnóstico e a data de óbito, sendo que até ao final do estudo todos os animais tinham morrido. Atendendo a que, em valores absolutos, o tempo de sobrevivência dos animais submetidos a cirurgia (n = 4) foi idêntico ao grupo dos animais sem qualquer intervenção, não foi feita a distinção entre os animais intervencionados/não intervencionados, sendo todos eles incluídos no mesmo grupo de estudo. Destes, 50% (2/4) apresentaram recorrência local do tumor. Contudo, devido ao baixo tamanho da amostra de animais intervencionados cirurgicamente, a recorrência local do tumor não foi avaliada.

Quanto à classificação T, 5% (n = 1) da amostra foi registada como T1 ($< 2\text{cm}$), 40% (n = 8) como T2 (2-4cm) e 55% (n = 11) como T3 ($> 4\text{cm}$). Em relação à classificação N, 70% (n = 14) pertencia a N0 e 30% (n = 6) a N1.

Quando aplicado o sistema de graduação histopatológica de Broder, foi possível distinguir que 45% (n = 9) dos tumores estavam incluídos no grau 1, 45% (n = 9) no grau 2, 5% (n = 1) no grau 3 e os outros 5% (n = 1) grau 4 (Tabela 1).

Em relação ao sistema de graduação multifatorial de Anneroth et al. os casos distribuíram-se da seguinte maneira: Grau II - 25% (n = 5); Grau III - 55% (n = 11); Grau IV - 20% (n = 4) (Tabela 2).

De acordo com o sistema de graduação histopatológica das margens invasivas de Bryne et al. 45% (n = 9) dos casos pertenciam ao grupo de bom prognóstico e os restantes 55% (n = 11) ao de prognóstico moderado (Tabela 3).

Tabela 1: Classificação da graduação histopatológica de acordo com os sistemas da OMS e de Broder de 20 casos de CECO felino.

Nº	OMS	Broder
	Grau de diferenciação celular	Grau
1	Moderadamente diferenciado	2
2	Moderadamente diferenciado	2
3	Moderadamente diferenciado	3
4	Bem diferenciado	1
5	Moderadamente diferenciado	4
6	Bem diferenciado	1
7	Moderadamente diferenciado	2
8	Moderadamente diferenciado	2
9	Bem diferenciado	1
10	Moderadamente diferenciado	2
11	Bem diferenciado	1
12	Bem diferenciado	1
13	Moderadamente diferenciado	2
14	Bem diferenciado	1
15	Moderadamente diferenciado	2
16	Bem diferenciado	1
17	Bem diferenciado	1
18	Bem diferenciado	1
19	Moderadamente diferenciado	2
20	Moderadamente diferenciado	2

Tabela 2: Classificação da graduação histopatológica de acordo com o sistema de Anneroth et al. de 20 casos de CECO felino.

Anneroth et al.									
Nº	Estrutura	Relativo à população celular do tumor			Relativo à relação tumor-hospedeiro			Total	Grupos de graduação
		Padrão de queratinização	Aberrações nucleares	Nº mitoses	Modo de invasao	Estágio de invasão	Resposta inflamatória		
1	2	2	4	2	4	4	2	20	III
2	3	2	3	3	4	4	3	22	IV
3	3	3	2	1	4	4	2	19	III
4	2	1	1	1	1	4	3	13	II
5	2	3	3	3	3	4	3	21	IV
6	1	2	3	3	2	3	3	17	III
7	2	2	2	2	3	4	2	17	III
8	3	3	4	3	4	4	1	22	IV
9	1	2	1	1	3	4	3	15	II
10	2	2	3	2	3	4	1	17	III
11	1	1	3	1	2	3	2	13	II
12	3	1	3	2	2	4	4	19	III
13	2	2	2	4	3	4	3	20	III
14	1	1	2	1	1	3	3	12	II
15	2	2	3	2	2	4	1	16	III
16	3	2	4	2	4	4	3	22	IV
17	1	1	3	1	2	3	2	13	II
18	2	2	2	4	1	4	2	17	III
19	2	2	4	3	2	3	2	18	III
20	2	2	4	3	3	4	2	20	III

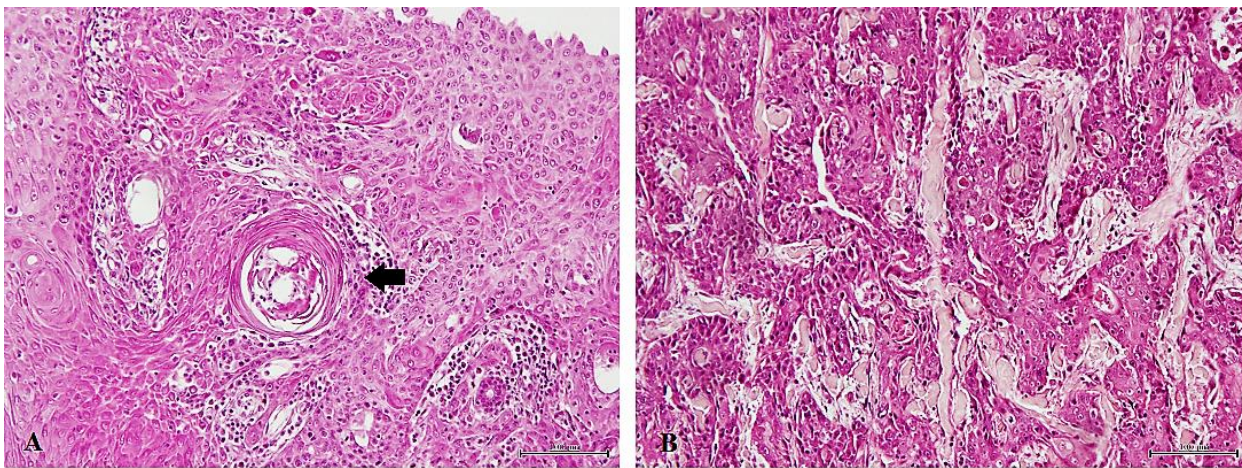
Tabela 3: Classificação da graduação histopatológica de acordo com o sistema de Bryne et al. de 20 casos de CECO felino.

Bryne et al.						
Nº	Grau de queratinização	Pleomorfismo nuclear	Padrão de invasão	Infiltrado Linfoplasmocitário	Total	Grupos de prognóstico
1	2	4	2	2	10	moderado
2	2	3	3	3	11	moderado
3	3	2	3	2	10	moderado
4	1	1	2	3	7	bom
5	3	3	2	3	11	moderado
6	2	3	1	3	9	moderado
7	2	2	2	2	8	bom
8	3	4	3	1	11	moderado
9	2	1	1	3	7	bom
10	2	3	2	1	8	bom
11	1	3	1	2	7	bom
12	1	3	3	4	11	moderado
13	2	2	2	3	9	moderado
14	1	2	1	3	7	bom
15	2	3	2	1	8	bom
16	2	4	3	3	12	moderado
17	1	3	1	2	7	bom
18	2	2	2	2	8	bom
19	2	4	2	2	10	moderado
20	2	4	2	2	10	moderado

3.2. Classificação histopatológica do CECO felino

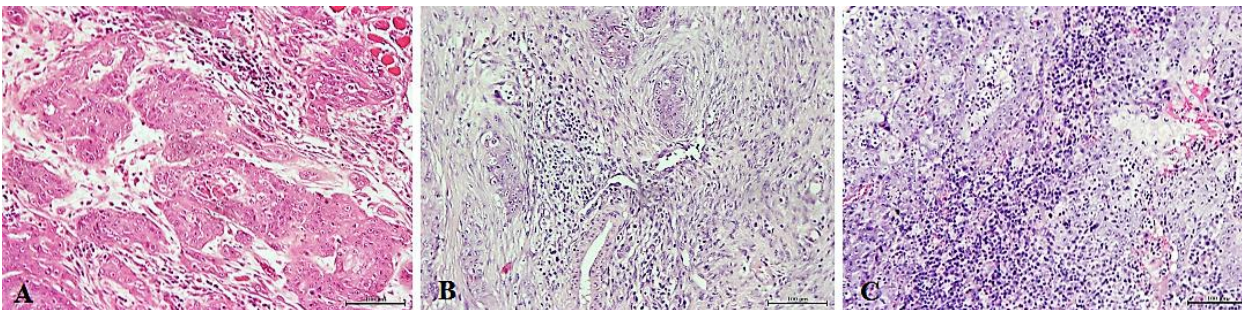
De acordo com a classificação histopatológica do grau de malignidade da OMS, foi possível distinguir que 45% (n = 9) dos tumores eram bem diferenciados e que os restantes 55% (n = 11) eram moderadamente diferenciados (Tabela 1). Não houve tumores classificados como pouco diferenciados neste estudo. Os tumores bem diferenciados assemelharam-se a um padrão normal de epitélio escamoso, tendo sido possível observar pérolas córneas e desmossomas. Nos tumores moderadamente diferenciados observou-se um certo grau de pleomorfismo nuclear, atividade mitótica moderada e pouca queratinização (Figura 11). Verificou-se a existência de infiltrado linfoplasmocitário em 95% dos casos (n = 19), sendo marcante em 15,8% dos casos (3/19), moderado em 42,1% (8/19) e leve nos restantes (Figura 12). A invasão perineural de pequenos nervos também foi observada em 15% dos casos (n = 3) (Figura 13).

Figura 11: Aspeto histológico dos diferentes graus de CECO felino.



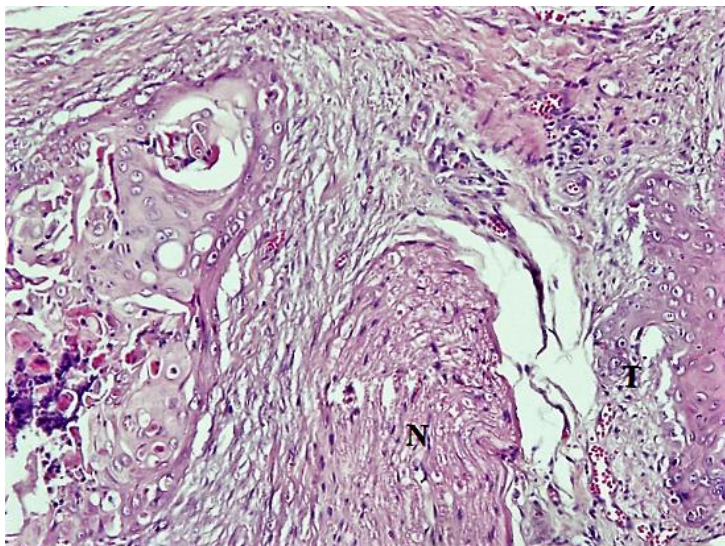
Legenda: (A) CECO felino bem diferenciado com presença de pérolas córneas. (B) CECO felino moderadamente diferenciado com poucas áreas de queratinização evidente (barra 100 µm).

Figura 12: Infiltrado linfoplasmocitário no CECO felino.



Legenda: (A) Infiltrado linfoplasmocitário leve. (B) Infiltrado linfoplasmocitário moderado. (C) Infiltrado linfoplasmocitário marcante (barra 100 µm).

Figura 13: CECO felino bem diferenciado com invasão perineural.



Legenda: Invasão neoplásica de um pequeno nervo. (N) nervo. (T) tumor. (barra 100 μ m).

3.3. Caracterização da marcação para o PCNA e p63

Todos os casos de CECO felino incluídos neste estudo tiveram uma marcação positiva para o PCNA, com uma percentagem de células PCNA-positivas variando entre 36,2 e 83,6%, com uma média de 67,3% ($\pm 10,9$). Considerando o sistema de graduação histopatológica da OMS, nos CECs orais bem diferenciados obteve-se maior marcação com o PCNA nas células localizadas à periferia das ilhotas tumorais, sendo que as células queratinizadas centrais foram, geralmente, negativas. A percentagem de marcação nestes tumores variou entre 36,2 e 74%. Nos CECs orais moderadamente diferenciados a distribuição da marcação foi mais heterogênea, sendo que a marcação variou entre 68,5 e 83,6% (Figura 14).

O *cutoff* utilizado foi de 68,5% com uma sensibilidade de 72,7% e uma especificidade de 55,6% (Figura 16, A). Dos tumores estudados 55% (n = 11) encontram-se acima desse *cutoff* e os restantes 45% (n = 9) abaixo do mesmo.

No que respeita à marcação para o p63 também todos os CECs orais felinos foram positivos, com uma marcação a variar entre 39,3 e 73,1%, com uma média de 48,8% ($\pm 8,3$).

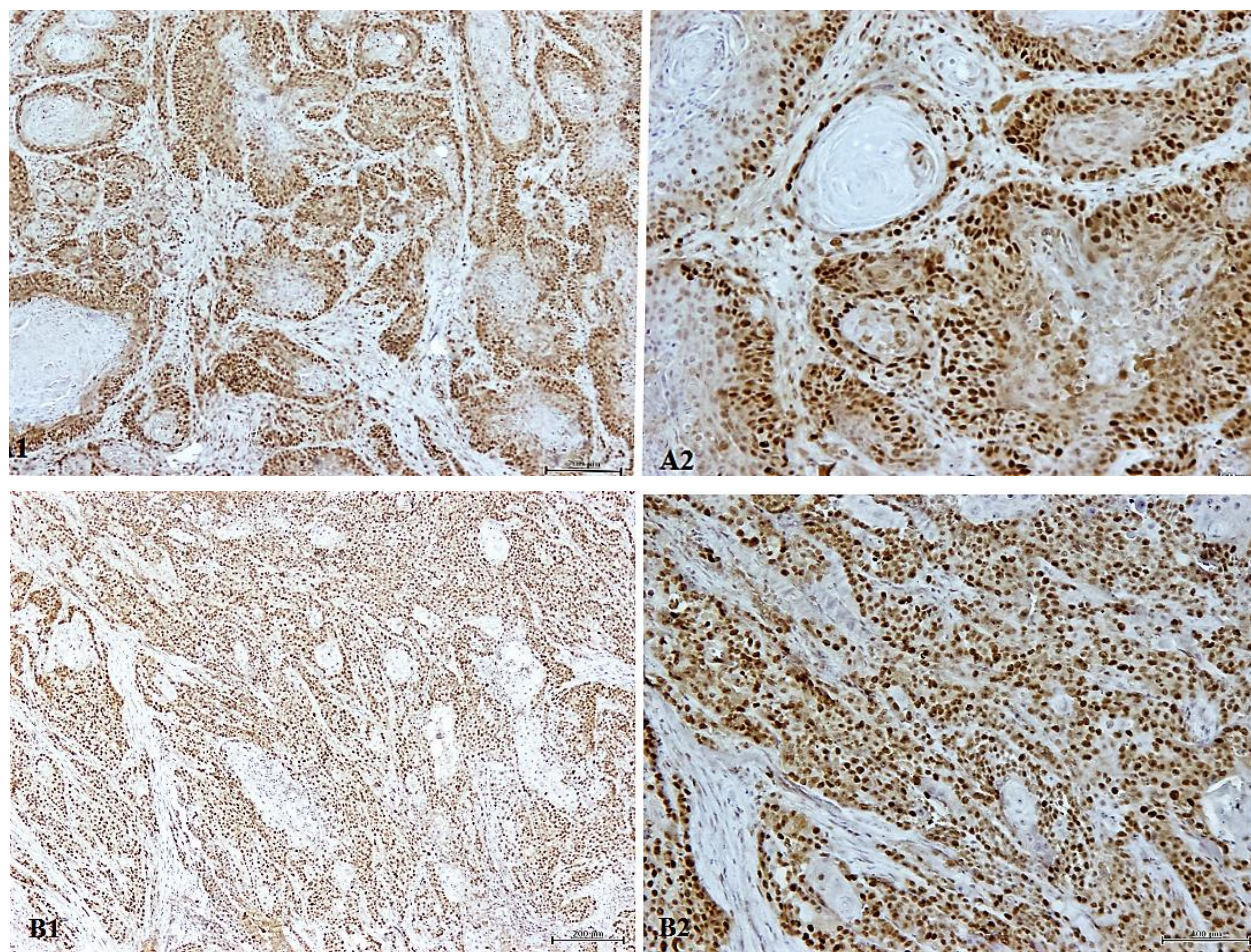
Os CECs orais bem diferenciados apresentaram expressão do p63 a nível das camadas basal e parabasal, embora seja mais forte na camada basal do que na parabasal, com uma percentagem de células p63-positivas a variar entre 40,7 e 60,4%. As células mais centrais apresentaram escassa marcação. Nos CECs orais moderadamente diferenciados a marcação é mais difusa e é também

observada a nível das camadas supra-basais. A percentagem de células marcadas destes tumores variou entre 39,3 e 73,1% (Figura 15).

O *cutoff* utilizado foi de 55,1% com uma sensibilidade de 36,4% e uma especificidade de 100% (Figura 16, B). Dos tumores estudados 15% (n = 3) encontram-se acima desse *cutoff*, enquanto os restantes 85% (n = 17) são inferiores ao mesmo.

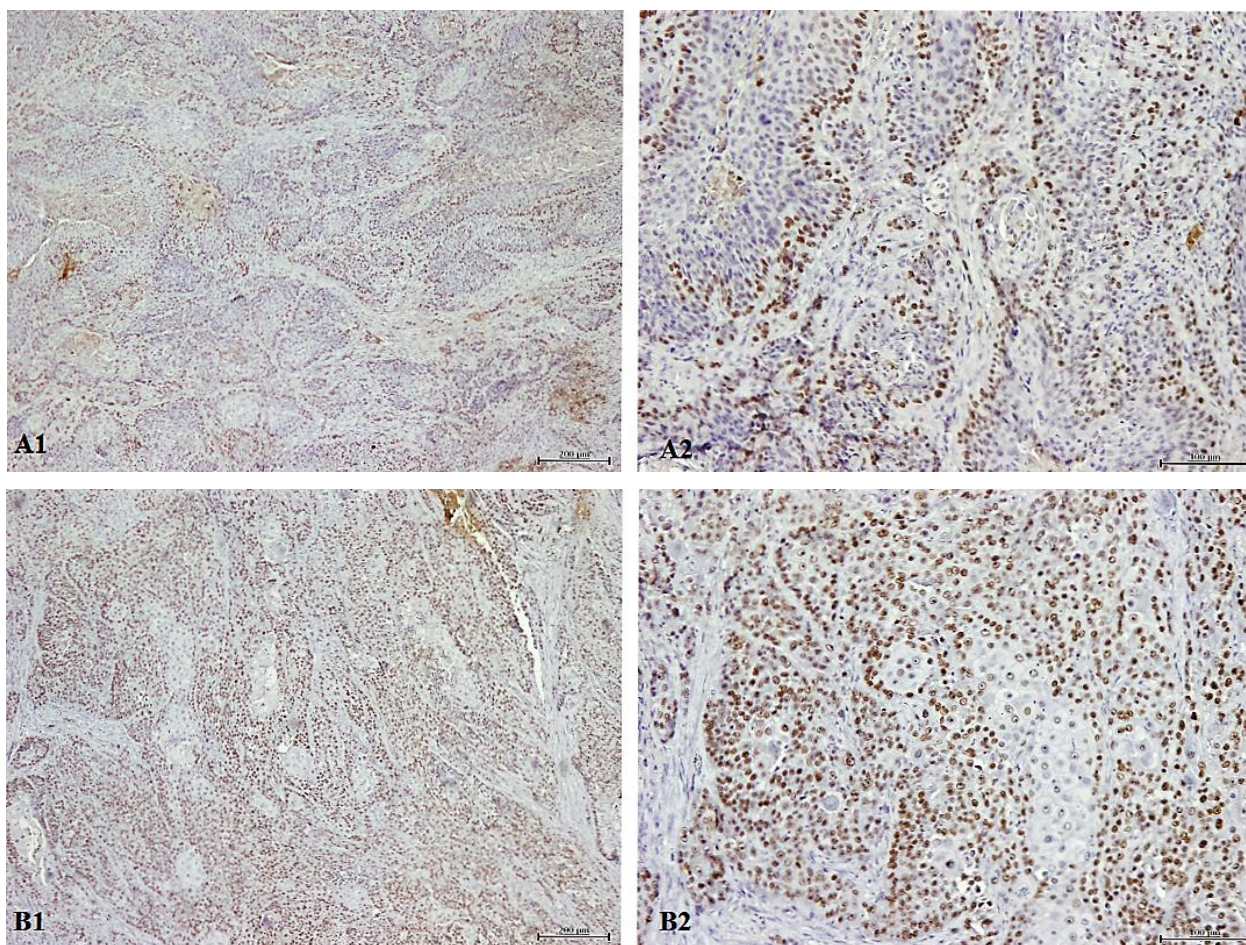
A intensidade de marcação do p63 também foi variável: 10% (n = 2) apresentaram marcação discreta, 25% (n = 5) moderada, 50% (n = 10) intensa e os outros 15% (n = 3) muito intensa.

Figura 14: Imunomarcação do PCNA em diferentes graus de CECO felino.



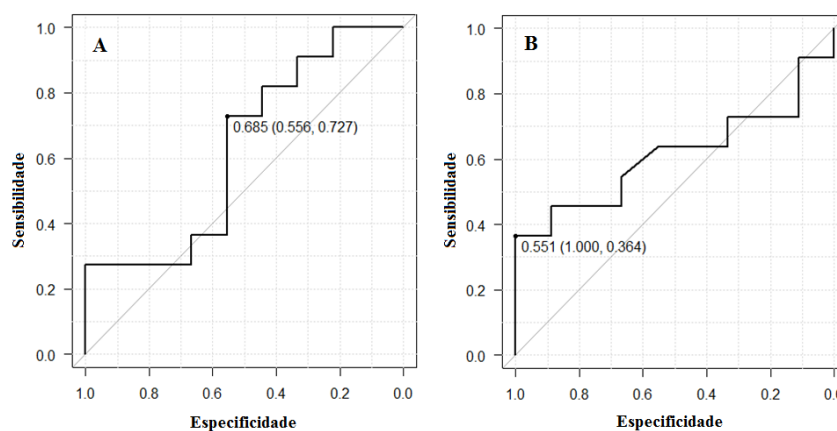
Legenda: (A) Imunomarcação do PCNA no CECO felino bem diferenciado. (B) Imunomarcação do p63 no CECO felino moderadamente diferenciado. (1) barra 200 μ m. (2) barra 100 μ m.

Figura 15: Imunomarcção do p63 em diferentes graus de CECO felino.



Legenda: (A) Imunomarcção do p63 no CECO felino bem diferenciado. (B) Imunomarcção do p63 no CECO felino moderadamente diferenciado. (1) barra 200 µm. (2) barra 100 µm.

Figura 16: Curvas ROC e melhores valores de corte do índice de marcação de PCNA e de p63 em 20 pacientes com CECO felino.

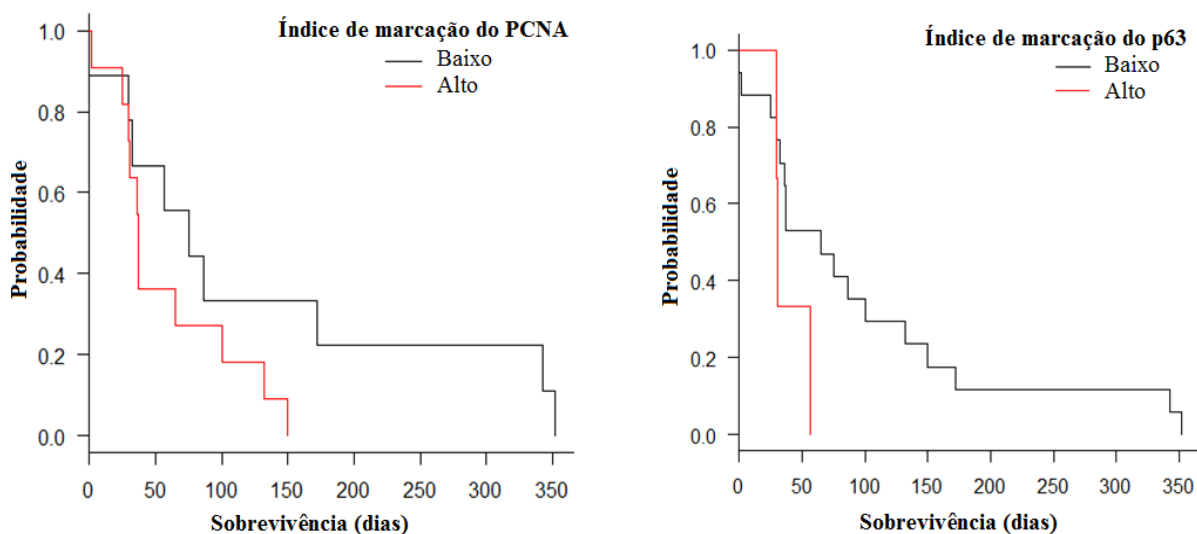


Legenda: (A) Curva de ROC do índice de marcação de PCNA com um *cutoff* = 68,5% para uma sensibilidade de 72,7% e uma especificidade de 55,6%. (B) Curva de ROC do índice de marcação de p63 com um *cutoff* = 55,1% para uma sensibilidade de 36,4% e uma especificidade de 100%.

3.4. Relação entre as características clinicopatológicas e o tempo de sobrevivência

Os resultados observados encontram-se sumarizados nas tabelas 4 e 5 e figuras 17 a 19. Não foi encontrada associação estatística entre as variáveis clinicopatológicas – idade, sexo, estágio, estágio T e N, graduação histopatológica do CECO de acordo com o sistema multifatorial de Anneroth et al. e o sistema de graduação das margens invasivas de Bryne – e o índice de marcação de PCNA (baixo ou alto) e de p63 com o tempo de sobrevivência. Porém, verificou-se uma tendência para os doentes com as seguintes características apresentarem uma mediana do tempo de sobrevivência inferior: fêmeas, com idade ≥ 10 anos, com valores de T=3, grau IV de Anneroth, grupo de prognóstico moderado de Bryne e com índices de marcação altos (acima do *cutoff*) de PCNA e de p63 (Figura 17).

Figura 17: Curvas de *Kaplan-Meier* comparando a estimativa da sobrevivência, em dias, dos doentes com marcação baixa e alta de PCNA ($p = 0,151$) e de p63 ($p = 0,130$).



A localização primária do tumor ($p = 0,032$), assim como a graduação histopatológica da OMS ($p = 0,009$) e o sistema de graduação histopatológica de Broder ($p = 0,015$) tiveram uma influência estatisticamente significativa no tempo de sobrevivência (Figuras 18 e 19). Quanto ao primeiro, tumores bem diferenciados apresentaram uma mediana de sobrevivência maior (124,56 dias) do que os moderadamente diferenciados (45,43 dias). Isto significa que 50% dos doentes com tumores bem diferenciados têm um tempo de sobrevivência de cerca de 125 dias, enquanto aqueles com tumores moderadamente diferenciados de cerca de 45 dias. Em relação ao último, o

teste de *logrank* mostrou haver uma diferença significativa na taxa de sobrevivência entre os graus 1 e 2, e 1 e 4 ($p < 0,05$).

Figura 18: Curvas de *Kaplan-Meier* comparando a estimativa da sobrevivência, em dias, dos doentes de acordo com a localização primária do tumor ($p = 0,032$).

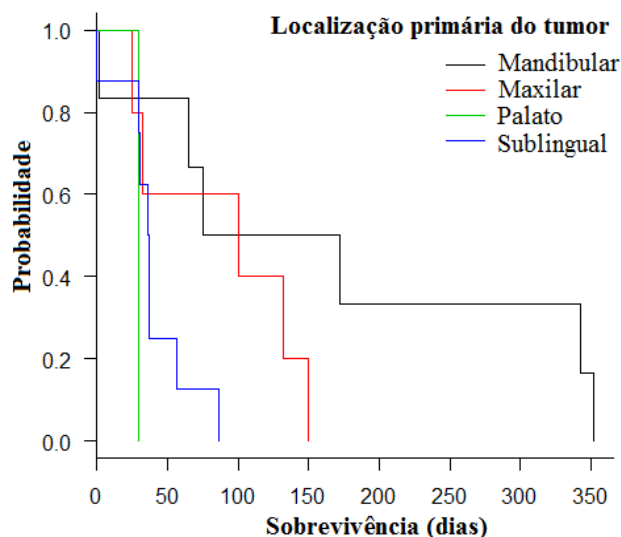


Figura 19: Curvas de *Kaplan-Meier* comparando a estimativa da sobrevivência, em dias, dos 20 casos de CECO felino de acordo com os diferentes graus obtidos segundo os sistemas de graduação histopatológica da OMS ($p = 0,009$) e de Broder ($p = 0,015$).

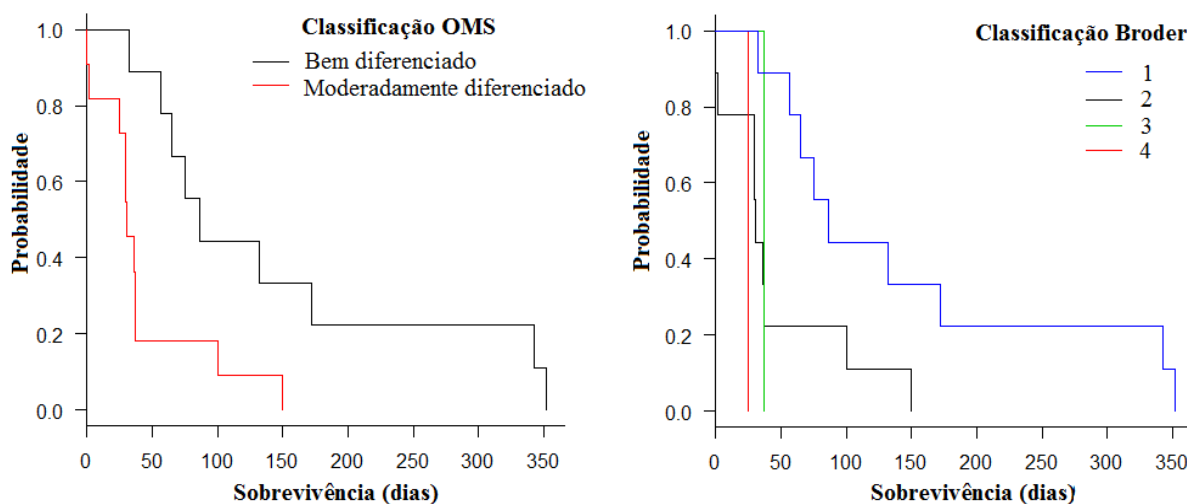


Tabela 4: Correlação entre o tempo de sobrevivência (dias) e as características clinicopatológicas de 20 casos de CECO felino.

Parâmetro	n	Mediana do tempo de sobrevivência (dias)	p-valor ¹
Idade			
<10	2	186,25	0,229
>10	18	78,61	
Sexo			
M	11	100	0,131
F	9	55,44	
Localização			
Mandibular	6	82,67	0,032
Maxilar	5	78,6	
Sublingual	8	39,25	
Palato	1	30	
Valor de T			
T1	1	343	0,125
T2	8	88,75	
T3	11	66,36	
Valor de N			
N0	14	79,85	0,875
N1	6	83,83	
OMS			
Bem diferenciado	9	124,56	0,009
Moderadamente diferenciado	11	43,45	
Anneroth et al.			
II	5	125,8	0,755
III	11	81	
IV	4	65,75	
Broder			
1	9	76,56	0,015
2	9	39,22	
3	1	37	
4	1	25	
Bryne et al.			
Bom	9	111,33	0,344
Moderado	11	71,41	

¹ Os valores de p-valor em negrito indicam diferenças significativas.

Tabela 5: Correlação entre o tempo de sobrevivência (dias) e o índice de marcação de PCNA e de p63 em 20 casos de CECO felino.

Parâmetro	n	Mediana do tempo de sobrevivência (dias)	p-valor
PCNA			
Baixa marcação	9	106	0,151
Alta marcação	11	58,64	
p63			
Baixa marcação	17	81,65	0,130
Alta marcação	3	39,33	

3.5. Relação entre as características clinicopatológicas e os índices de marcação de PCNA e de p63

A classificação T e a marcação para o PCNA estão significativamente correlacionadas ($p = 0,005$), tendo sido encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos T1-T2 e T1-T3. Pelo contrário, o mesmo não aconteceu em relação ao grupo T2-T3. Pelas razões previamente indicadas, as mesmas conclusões poderão ser retiradas em relação ao estágio.

Quanto aos sistemas de graduação histopatológica, apenas o da OMS ($p = 0,012$) e o de Broder ($p = 0,013$) mostraram estar relacionados com a expressão de PCNA. No sistema de graduação histopatológica da OMS, houve uma maior expressão de PCNA nos tumores moderadamente diferenciados ($73,0 \pm 5,9\%$) relativamente aos bem diferenciados ($60,3 \pm 11,7\%$). Na classificação de Broder, os diferentes graus não apresentaram diferenças significativas entre si (Tabela 7).

A marcação para o p63 apenas mostrou ter uma relação estatisticamente significativa com a classificação de N ($p = 0,048$). Todas as outras características clinicopatológicas não pareceram estar correlacionadas com este marcador.

As relações obtidas entre as características clinicopatológicas e imunohistoquímicas dos casos estudados estão resumidas na Tabela 6.

Tabela 6: Correlação entre o índice de marcação de PCNA e de p63 e as características clinicopatológicas de 20 casos de CECO felino.

Parâmetro	n	Índice de marcação de PCNA (%)		Índice de marcação de p63 (%)	
		Média (± desvio padrão)	p-valor ³	Média (± desvio padrão)	p-valor ³
Idade					
<10	2	59,9 (± 33,5)	0,788	42,3 (± 4,2)	0,256
≥10	18	68,1 (± 7,7)		49,5 (± 8,4)	
Sexo					
M	11	65,9 (± 14,4)	0,533	46,3 (± 5,8)	0,382
F	9	68,9 (± 4,0)		51,8 (± 10,1)	
Localização					
Mandibular	6	59,3 (± 13,9)	0,184	45,2 (± 4,1)	0,270
Maxilar	5	72,4 (± 8,1)		46,4 (± 5,3)	
Sublingual	8	69,8 (± 8,1)		49,9 (± 7,6)	
Palato	1	68,5 (± NA)		73,1 (± NA)	
Classificação T					
T1	1	36,2 (± NA)	0,005	45,2 (± NA)	0,821
T2	8	70,1 (± 7,9)		50,7 (± 10,9)	
T3	11	68,0 (± 8,9)		47,7 (± 6,4)	
Classificação N					
N0	14	68,3 (± 12,0)	0,453	58,8 (± 9,2)	0,048
N1	6	64,8 (8,1)		44,0 (± 0,9)	
OMS					
Bem diferenciado	9	60,3 (± 11,7)	0,012	47,6 (± 6,2)	0,732
Moderadamente diferenciado	11	73,0 (± 5,9)		49,8 (± 9,8)	
Anneroth et al.					
II	5	65,8 (± 7,7)	0,829	49,7 (± 7,9)	0,363
III	11	66,8 (± 11,8)		50,2 (± 9,4)	
IV	4	70,3 (± 14,3)		43,6 (± 2,8)	
Broder					
1	9	60,3 (± 11,7)	0,013	47,6 (± 6,2)	0,136
2	9	70,7 (± 3,3)		51,7 (± 9,9)	
3	1	83,6 (± NA)		42,8 (± NA)	
4	1	83,6 (± NA)		39,3 (± NA)	
Bryne et al.					
Bom	9	67,7 (± 6,2)	0,873	48,5 (± 6,1)	0,648
Moderado	11	66,9 (± 13,9)		49,0 (± 10,0)	

³ Os valores de p-valor em negrito indicam diferenças significativas.

Tabela 7: Teste de *Tukey* para os dados encontrados na Tabela 6 que mostraram significância com o índice de marcação de PCNA.

Índice de marcação do PCNA (%)		
Classificação T	n	Média ²
T1	1	36,2 ^a
T2	8	70,1 ^b
T3	11	68,0 ^b
Broder		
1	9	60,3 ^c
2	9	70,7 ^c
3	1	83,6 ^c
4	1	83,6 ^c

² Médias indicadas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de *Tukey* ($\alpha = 5\%$).

3.6. Relação entre a intensidade de marcação do p63 e a percentagem de células marcadas para o p63

O coeficiente de *Spearman* ($r_s = 0,379$) parece indicar uma correlação positiva entre a percentagem de marcação para o p63 e a intensidade dessa marcação (Figura 20). A intensidade desta correlação é considerada regular de acordo com a tabela de avaliação qualitativa do grau de correlação entre duas variáveis (Anexo I). De forma a determinar se esse valor é um achado casual ou é evidência de que a correlação realmente existe utilizou-se a tabela dos valores críticos para o coeficiente de correlação de *Spearman* (r_s) (Anexo I). O valor tabelado de r_s para um teste bilateral, $\alpha = 0,05$ e $n = 20$ é $r_{s(0,05; 20)} = 0,447$. Uma vez que o valor obtido foi inferior ao tabelado, a correlação não é estatisticamente significativa para o nível α selecionado.

3.7. Relação entre os índices de marcação do PCNA e do p63

O coeficiente de *Spearman* ($r_s = 0,056$) indica uma intensidade de correlação fraca entre a marcação para o PCNA e a marcação para o p63 (Figura 21), de acordo com a tabela de avaliação qualitativa do grau de correlação entre duas variáveis (Anexo I). De igual forma ao anteriormente referido, uma vez o coeficiente de *Spearman* calculado é inferior ao valor tabelado, esta correlação não é estatisticamente significativa para o nível α selecionado.

Figura 20: Diagrama de dispersão com valor de r_s correspondente entre o índice de marcação de p63 e da sua intensidade de marcação de 20 casos de CECO felino.

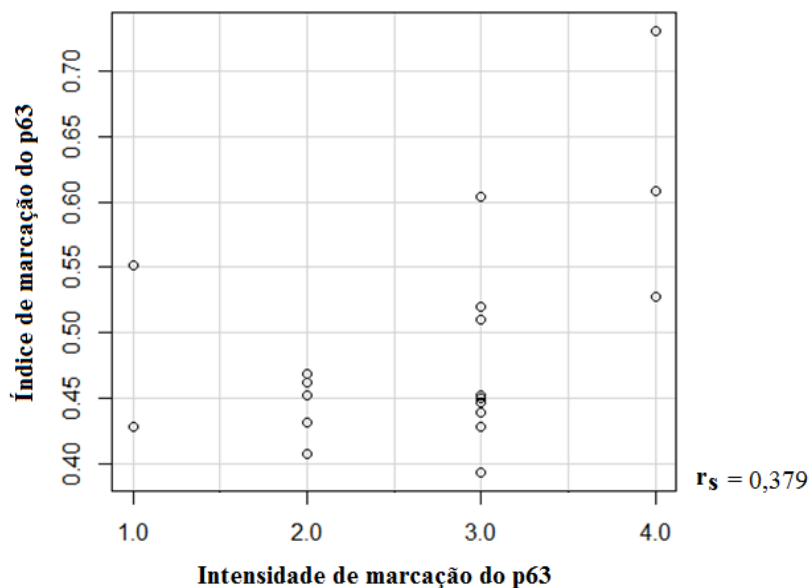
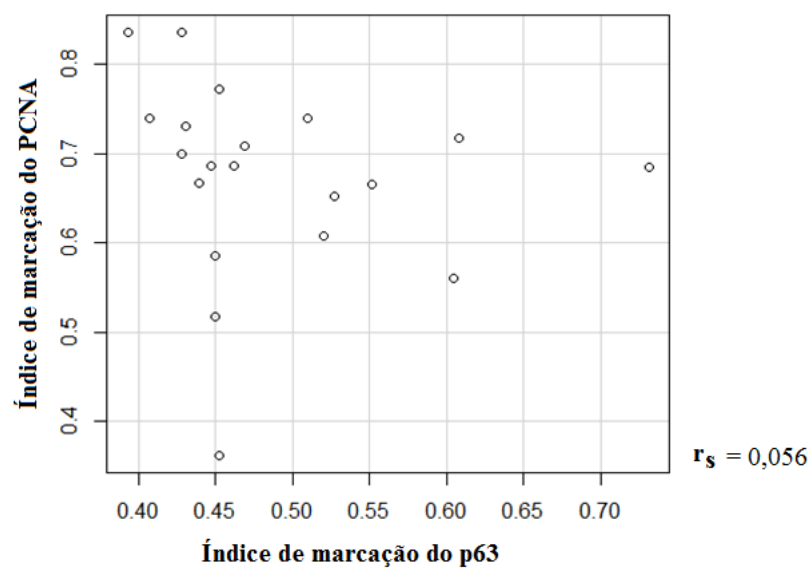


Figura 21: Diagrama de dispersão com valor de r_s correspondente entre o índice de marcação de PCNA e de p63 de 20 casos de CECO felino.



4. Discussão

Tal como em medicina humana, o CECO continua a ser um dos tumores mais difíceis de controlar e tem vindo a haver muito pouca melhoria na taxa de sobrevivência ao longo dos últimos anos (Wang et al., 2013).

As características clinicopatológicas idade, sexo e os estádios T e N não mostraram estar relacionados com o tempo de sobrevivência, à semelhança do já observado em humanos (Myoung et al., 2006) e cães (Mestrinho et al., 2014a). Quanto à localização primária do tumor, embora o estudo de Mestrinho et al. (2014a) não tenha encontrado uma relação estatisticamente significativa com o tempo de sobrevivência, o mesmo não se sucedeu neste estudo ($p = 0,032$). Contudo, enquanto o estudo de Mestrinho et al. (2014a) considerou apenas animais intervencionados cirurgicamente, este estudo baseou-se no tempo de sobrevivência decorrido entre a data de diagnóstico e a data de óbito, intervencionando ou não os animais cirurgicamente. De acordo com as medianas do tempo de sobrevivência, o CEC mandibular é o que apresenta melhor prognóstico (82,67 dias), seguindo-se o maxilar (78,6 dias) e, por fim, o sublingual (39,25 dias). Os casos de CEC mandibular são os que são normalmente intervencionados cirurgicamente com maiores hipóteses de sucesso sendo que, neste estudo, 75% (3/4) dos animais intervencionados apresentavam tumores com esta localização. Devido ao reduzido tamanho da amostra de CEC do palato ($n = 1$), não podem ser retiradas conclusões significativas. Em medicina humana, a mesma conclusão relativamente ao CEC mandibular já tinha sido descrita (Bradley et al., 2011; Liptak & Withrow, 2013).

Embora a presença de metástases nos linfonodos regionais seja um fator de prognóstico importante em medicina humana (Shingaki et al., 1988), este estudo não o permitiu comprovar em gatos. Uma razão poderá ter a ver com as limitações deste estudo no que respeita ao diagnóstico de metastização, pois nem sempre foi possível proceder à recolha de biópsias de linfonodos e posterior realização de exame citológico ou histopatológico. Em alguns casos, a presença de metástases foi apenas baseada na palpação dos linfonodos, considerando-se haver metastização quando os mesmos se encontravam aumentados, e/ou em técnicas de imagem como a TC.

Dos sistemas de gradação histopatológica considerados na revisão bibliográfica, apenas quatro foram incluídos no estudo devido a limitações oferecidas pelas amostras. O sistema de avaliação histopatológica de risco de Brandwein-Gensler et al. requeria informação acerca da invasão perineural, só tendo sido encontrada a presença de nervos apenas em 15% ($n = 3$) dos casos pelo

que, não se tornava significativa a sua inclusão. O modelo BD de Almangush et al. também não pôde ser estudado por não ser possível avaliar a profundidade de invasão nos fragmentos usados. Relativamente aos sistemas de gradação histopatológica estudados, apenas o da OMS e o de Broder tiveram uma relação estatisticamente significativa com o tempo de sobrevivência. Quanto ao primeiro, tal como o observado por Lo Muzio et al. (2007) em humanos, no gato, os tumores mais diferenciados apresentaram melhor prognóstico (mediana do tempo de sobrevivência = 124,56 dias) do que os menos diferenciados (43,45 dias). Em relação à classificação de Broder, o teste de *logrank* mostrou que havia uma diferença significativa na taxa de sobrevivência entre os graus 1 e 2, e 1 e 4. Contudo, a relação encontrada entre o grau 1 e 4 não deverá ser tomada em conta devido ao baixo número de casos classificados como grau 4 ($n = 1$). De acordo com diversos estudos realizados no homem, não foi encontrada qualquer associação significativa deste sistema com o prognóstico (Bhargava et al., 2010; Doshi, Shah, Patel & Jhabuawala, 2011; Jamadar, Narayan, Shreedhar, Mohanty & Shenoy, 2014; Sawazaki-Calone et al., 2015).

Neste estudo a marcação para o PCNA não mostrou ter uma relação significativa com a sobrevivência tal como observado no estudo de Myoung et al. (2006), provavelmente devido ao pequeno tamanho da amostra.

Tal como no trabalho de Kato et al. (2011) a idade, o sexo, a localização primária do tumor e a classificação N não exibiram uma correlação significativa com a expressão de PCNA.

Quanto à relação entre a classificação T e a expressão do PCNA, esta mostrou ser estatisticamente significativa, como já tinha sido referido por Kato et al. (2011). Embora tenha sido encontrada uma correlação significativa entre os grupos T1-T2 e T1-T3, esta poderá ter sido obtida ao acaso pelo facto do grupo T1 ser constituído apenas por 1 caso. Entre os grupos T2-T3 não existiu essa limitação, contudo a sua relação não mostrou ser significativa.

Neste estudo existiu uma correlação entre a expressão de PCNA e o grau histológico (OMS) do CECO felino, verificando-se uma maior expressão de PCNA nos tumores moderadamente diferenciados ($73,0 \pm 5,9\%$) relativamente aos bem diferenciados ($60,3 \pm 11,7\%$), tal como previamente já tinha sido descrito em medicina humana (Störkel et al., 1993; Staibano et al., 1998; Krecicki et al., 1999; Kato et al., 2011; Poosarla et al., 2015).

Foram encontradas diferenças significativas, entre os graus de Broder e a expressão de PCNA, ou seja, que a expressão de PCNA é significativamente diferente entre cada grau da classificação da OMS. Posteriormente, de modo a avaliar quais os graus que diferem entre si, utilizou-se o teste de *Tukey* o qual não encontrou diferenças significativas entre as suas médias. Isto pode dever-se

ao facto do teste de *Tukey* ser, de certa forma, independente do teste ANOVA e ter o seu valor de *p* ajustado pelo facto de se estarem a fazer comparações múltiplas, o que leva a uma menor sensibilidade do teste.

Neste estudo, todos os CECs orais felinos mostraram uma marcação positiva para o p63, o que sugere que poderá haver reativação desta proteína secundária à mutação do gene e/ou sobre-expressão da mesma. Esta marcação positiva na maioria dos CECs tem-se verificado não só no Homem como também no cão (Mestrinho et al., 2014b).

Este estudo não permitiu encontrar nenhuma associação significativa entre a marcação de p63 e o prognóstico, tal como verificado por outros autores (Choi et al., 2002; De Oliveira, Ribeiro-Silva & Zucoloto, 2007). A elevada marcação de p63 poderá corresponder a dois grupos de proteínas, TA e ΔN , os quais desempenham funções opostas, sendo que o primeiro favorece a diferenciação celular e o segundo a proliferação celular (Foschi et al., 2004). Nylander, et al. (2000) e Foschini et al. (2004) descreveram a ocorrência de uma sobre-expressão de $\Delta Np63$ no CECO, podendo mesmo ser o único grupo expresso. Como tal, a falta de correlação encontrada entre a marcação para o p63 e o prognóstico poderá justificar-se por duas razões:

(1) Falta de especificidade na avaliação das diferentes isoformas devido ao anticorpo utilizado para a técnica de imunohistoquímica reconhecer todas as isoformas do p63, não sendo, portanto capaz de as discriminar. Desta forma, não é possível aferir se a elevada marcação é feita pelo grupo TAp63 e/ou pelo $\Delta Np63$ e, consequentemente, concluir se se trata de um tumor de bom ou mau prognóstico, respetivamente.

(2) Amostra em estudo de reduzida dimensão, não havendo relação com o anticorpo usado.

À semelhança do descrito em medicina humana, não foi encontrada qualquer correlação estatisticamente significativa entre a expressão do p63 e características clinicopatológicas como o sexo, a idade, o tamanho do tumor, a localização primária do tumor e o estadiamento TNM (Lo Muzio et al., 2005; Moergel et al., 2010; Lauxen et al., 2014). Apenas a classificação N mostrou relacionar-se significativamente com a marcação de p63 ($p = 0,048$), tal como tinha sido descrito por Re et al. (2014) em humanos.

Tal como verificado pelos autores França et al. (2007), Moergel et al. (2010) e Lauxen et al. (2014), nenhuma correlação entre a marcação para o p63 e o grau histológico (OMS) foi encontrada. Este estudo tomou em consideração outros sistemas previamente descritos, contudo nenhum deles mostrou ter associação com a expressão de p63.

Embora a marcação baixa/alta baseada no *cutoff* do PCNA e do p63 não tenha tido nenhum efeito estatisticamente significativo na taxa de sobrevivência, verificou-se uma tendência para as marcações acima desse valor terem pior prognóstico. Uma marcação baixa de PCNA teve uma mediana de sobrevivência de 106 dias, enquanto que a mesma para uma marcação alta foi de 58,64 dias. O mesmo aconteceu relativamente ao p63, em que uma marcação baixa apresentou uma mediana de sobrevivência de 81,65 dias e uma marcação alta teve uma de 39,33 dias. Para o marcador p63 o *cutoff* ideal revelou uma sensibilidade de 36,4% e uma especificidade de 100%. No caso desta relação ter sido significativa, este valor de especificidade seria muito útil neste estudo uma vez que, permitiria aferir que 100% dos casos de CECO com baixa expressão de p63 tinham um bom prognóstico e, como tal, poderia ser justificável o investimento em medidas terapêuticas.

Os índices de marcação do PCNA e p63 não mostraram estar correlacionados ($r_s = 0,056$). Poderão haver duas razões para o teste estatístico estar a indicar que os dados amostrais não apoiam a existência de correlação populacional:

- (1) não existe realmente correlação entre x e y na população e o valor de $r_s = 0,056$ foi um resultado espúrio;
- (2) existe correlação, mas neste estudo não foi possível mostrar essa associação, provavelmente por causa do pequeno tamanho da amostra.

Por fim, quanto ao padrão da marcação do PCNA e do p63 nos diferentes graus do CECO felino, não foram encontradas diferenças dignas de comentário em relação ao que já tem vindo a ser documentado no cão e em medicina humana (Krecicki et al., 1999; Chen et al., 2004; Lo Muzio et al., 2005; Mestrinho et al., 2014a; Mestrinho et al., 2014b; Poosarla et al., 2015).

O facto de este trabalho ser um estudo retrospectivo apresenta algumas limitações dificilmente ultrapassáveis, tais como:

- (1) reduzido número de casos que cumpram os critérios de inclusão no estudo;
- (2) ausência de biópsia dos linfonodos regionais e posterior exame citológico ou histopatológico para confirmação efetiva de metastização em alguns casos;
- (3) os fragmentos estudados poderão não representar todas as áreas do tumor, nomeadamente, não garantindo a avaliação de toda a extensão tumor e sobretudo da profundidade de invasão.

Considerando estas limitações, deverá ser feito um estudo prospetivo por forma a conduzir um estudo cientificamente mais controlável.

5. Conclusão e perspectivas futuras

Os objetivos propostos no presente trabalho foram alcançados podendo-se concluir que:

- (1) Características clinicopatológicas como a idade, o sexo, o estágio tumoral, a classificação de T e de N, o Sistema de Graduação Histopatológica Multifatorial de Anneroth et al., o Sistema de Graduação das Margens Invasivas de Bryne et al. e a expressão de PCNA e de p63 não apresentam nenhum efeito estatisticamente significativo no prognóstico.
- (2) A localização primária do tumor parece ser um bom indicador de prognóstico, sendo os sistemas de graduação histopatológica mais relevantes na previsão do prognóstico de doentes com CECO o Sistema de Graduação Histopatológica do Grau de Malignidade da OMS e o Sistema de Graduação Histopatológica de Broder.
- (3) A classificação T e o estágio parecem estar significativamente correlacionados com o índice de marcação de PCNA a nível dos grupos T1-T2 e T1-T3 e, dos estádios I-II e I-III, respetivamente. Assim, a expressão de PCNA poderá ser usada na previsão do tamanho tumoral, o que pode facilitar o planeamento cirúrgico pois muitas vezes, uma avaliação visual pode subestimar o tamanho real do tumor, pelo facto destas massas tenderem a ser mais extensas e invasivas do que aparentam.
- (4) Quanto à relação entre os sistemas de graduação histopatológica estudados e a expressão dos marcadores PCNA e p63, pode concluir-se que a expressão de PCNA poderá ser utilizada na determinação do grau de diferenciação da OMS e no grau de classificação de Broder, enquanto a expressão de p63 não parece ter utilidade a este nível.
- (5) Apesar do papel incerto da proteína p63 na carcinogénese oral, a sua expressão parece ser um indicador preditivo da metastização dos linfonodos regionais.
- (6) Não existe correlação significativa entre o índice de marcação de PCNA e de p63, nem entre este último e a sua intensidade de marcação.

Que o autor tenha conhecimento, até ao momento não existe nenhum estudo que avalie a relação dos marcadores PCNA e p63 com as características clinicopatológicas e o prognóstico de gatos com CECO. Os marcadores estudados, quando utilizados independentemente, poderão ser considerados ferramentas úteis para usar em associação com a classificação histológica na avaliação do grau de diferenciação dos CECs orais felinos.

No futuro, o estudo destes e de outros marcadores tumorais, bem como outros fatores de prognóstico deverão ser alvo de mais investigação por forma a auxiliar na tomada de decisões e orientação terapêutica.

Bibliografia

- Akhter, M., Hossain, S., Rahman, Q.B. & Molla M.R. (2011). A study on histological grading of oral squamous cell carcinoma and its co-relationship with regional metastasis, *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 15(2), 168–176.
- Allison, R. T. & Best, T. (1998). p53, PCNA and Ki-67 expression in oral squamous cell carcinomas: the vagaries of fixation and microwave enhancement of immunocytochemistry, *Journal of Oral Pathology & Medicine : Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 27(9), 434–440.
- Almangush, A., Coletta, R. D., Bello, I. O., Bitu, C., Keski-Santti, H., Makinen, L.L., Kauppila, J.H., Pukkila, M., Hagstrom, J., Laranne, J., Tammola, S., Soini, Y., Kosma, V.M., Koivunen, P., Kowalski, L.P., Nieminen, P., Grénman, R., Leivo, I. & Salo, T. (2015). A simple novel prognostic model for early stage oral tongue cancer. *International Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, 44, 143–150.
- Almangush, A., O. Bello, I., Keski-Santti, H., Makinen, L.K., Kauppila, J.H., Pukkila, M., Hagstrom, J., Laranne, J., Tammola, S., Nieminen, O., Soini, Y., Kosma V., Koivunen, P., Grénman, R., Leivo, I. & Salo, T. (2014). Depth of invasion, tumor budding, and worst pattern of invasion: Prognostic indicators in early-stage oral tongue cancer, *Head Neck*, 36, 811–818.
- Alves, C.C.M., Netto, F.O.G., de Sousa, S.F., Bernardes, V.F. & de Aguiar, M.C.F. (2011). Carcinoma de células escamosas de boca: Relação entre graduação histopatológica e características clínicas da neoplasia. *Pesquisa Brasileira Em Odontopediatria E Clinica Integrada*, 11(4), 485–489.
- Anantharaman, D., Chabrier, A., Gaborieau, V., Franceschi, S., Herrero, R., Rajkumar, T., Samant, T., Mahimkar, M.B., Brennan, P. & McKay, J. D. (2014). Genetic variants in nicotine addiction and alcohol metabolism genes, oral cancer risk and the propensity to smoke and drink alcohol: A replication study in India, *PLoS ONE*, 9(2).
- Anneroth, G., Batsakis, J. & Luna, M. (1987). Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas, *Scandinavian Journal of Dental Research*, 95, 229-49.
- Bertone, E.R., Snyder, L.A. & Moore A.S. (2003). Environmental and lifestyle risk factors for oral squamous cell carcinoma in domestic cats, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17(4), 557–562.
- Bhargava, A., Saigal, S. & Chalisehar, M. (2010). Systems In Oral Squamous Cell Carcinoma: A Review, *Journal of International Oral Health*, 2(4), 1–10.
- Bilgic, O., Duda, L., Sánchez, M. D., & Lewis, J. R. (2015). Feline Oral Squamous Cell Carcinoma: Clinical Manifestations and Literature Review. *Journal of Veterinary Dentistry*, 32(1), 30–40.

- Bockmühl, U., Schlüns, K., Küchler, I., Petersen, S. & Petersen, I. (2000). Genetic imbalances with impact on survival in head and neck patient, *The American Journal of Pathology*, 157, 369–375.
- Bortoluzzi, M. C., Yurgel, L. S., Dekker, N. P., Jordan, R. C. K., & Regezi, J. A. (2004). Assessment of p63 expression in oral squamous cell carcinomas and dysplasias. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 98(6), 698–704.
- Bostock, D.E. (1972). The prognosis in cats bearing squamous cell carcinoma, *Journal of Small Animal Practice*, 13, 119–125.
- Bradley R., Schmidt & Crystal M.A. (2011). Oral Neoplasia. In Norsworthy, G. D. (Ed.). *The Feline Patient* (4th ed.). (pp. 361–363). Iowa: Blackwell.
- Bradley, R.L., MacEwen, E.G. & Loar, A.S. (1984). Mandibular resection for removal of oral tumors in 30 dogs and 6 cats, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 184, 460–463.
- Brandwein-Gensler, M., Smith, R.V., Wang, B., Penner, C., Theilken, A., Broughel, D., Schiff, B., Owen, R.P., Smith, J., Sarta, C., Hebert, T., Nason, R., Ramer, M., DeLacure, M., Hirsch, D., Myssiorek, D., Heller, K., Prystowsky, M., Schlecht, N.F. & Negassa, A. (2010). Validation of the histologic risk model in a new cohort of patients with head and neck squamous cell carcinoma, *The American Journal of Surgical Pathology*, 34(5), 676–88.
- Bregazzi, V.S., LaRue, S.M., Powers, B.E., Fettman, M.J., Ogilvie, G.K. & Withrow, S.J. (2001). Response of feline oral squamous cell carcinoma to palliative radiation therapy, *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 42(1), 77–79.
- Bryne, M., Koppang, H. S., Lilleng, R., & Kjaerheim, a. (1992). Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *The Journal of Pathology*, 166(4), 375–381.
- Callegari-Jacques, S.M. (Ed.). (2003). *Bioestatística: princípios e aplicações*. São Paulo: Artmed Editora.
- Cannon, C. (2015). Cats, Cancer and Comparative Oncology. *Veterinary Sciences*, 2(3), 111–126.
- Carter, R. (1992). Pathology of squamous carcinomas of the head and neck, *Current Opinion in Oncology*, 4, 485–490.
- Carvalho, J.K.M.R. (2006). *Carcinoma de células escamosas em gato doméstico (felis catus) – doença de bowen – relato de caso*. Dissertação de pós-graduação do Curso de Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais. Campo Grande: UCB.
- Chen, Y.K., Huse, S.S. & Lin, L.M. (2004). Differential expression of p53, p63 and p73 protein and mRNA for DMBA-induced hamster buccal-pouch squamous-cell carcinomas, *International Journal of Experimental Pathology*, 85(2), 97–104.

- Chiang, C.P., Lang, M.J., Liu, B.Y., Wang, J.T., Leu, J.S., Hahn, L.J. & Kuo, M.Y.P. (2000). Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in oral submucous fibrosis, oral epithelial hyperkeratosis and oral epithelial dysplasia in Taiwan. *Oral Oncology*, 36(4), 353–359.
- Choi, H.R., Batsakis, J.G., Zhan, F., Sturgis, E., Luna, M.A. & EL-Naggar, A.K. (2002). Differential expression of p53 gene family members p63 and p73 in head and neck squamous tumorigenesis, *Human Pathology*, 33, 158–64.
- Cotra, Kumar R. Patologia - Bases patológicas das doenças. 7a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.
- Cotter, S.M. (1981). Oral pharyngeal neoplasms in the cat, *Journal of the American Animal Hospital Association*, 17, 917–920.
- de Castro Ribeiro Lindenblatt, R., Martinez, G. L., Silva, L. E., Faria, P. S., Camisasca, D. R., & de Queiroz Chaves Lourenço, S. (2012). Oral squamous cell carcinoma grading systems - Analysis of the best survival predictor. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 41(1), 34–39.
- De Oliveira, L.R., Ribeiro-Silva, A. & Zucoloto, S. (2007). Prognostic impact of p53 and p63 immunoexpression in oral squamous cell carcinoma, *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 36(4), 191–197.
- De Sousa, F.A.C.G., Paradella, T.C., Carvalho, Y.R. & Rosa, L.E.B. (2009). Comparative analysis of the expression of proliferating cell nuclear antigen, p53, bax, and bcl-2 in oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma, *Annals of Diagnostic Pathology*, 13(5), 308–12.
- Dohn, M., Zhang, S. & Chen, X. (2001). p63 α and Δ Np63 α can induce cell cycle arrest and apoptosis and differentially regulate p53 target genes, *Oncogene*, 20, 3193–3205.
- Doorbar, J. (2007). Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection, *Disease Markers*, 23(4), 297–313.
- Doshi, N.P., Shah, S.A., Patel, K.B & Jhabuawala, M.F. (2011). Histological grading of oral cancer: a comparison of different systems and their relation to lymph node metastasis, *National Journal of Community Medicine*, 2(1), 136–142.
- Edge, S.B. & Compton, C.C. (2010). The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of Surgical Oncology*, 17(6), 1471–4.
- Fidel, J., Lyons, J., Tripp, C., Houston, R., Wheeler, B., & Ruiz, A. (2011). Treatment of Oral Squamous Cell Carcinoma with Accelerated Radiation Therapy and Concomitant Carboplatin in cats, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25, 504–510.
- Fidel, J.L., Sellon, R.K., Houston, R.K. & Wheeler, B.A. (2007). A nine-day accelerated radiation protocol for feline squamous cell carcinoma, *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 48, 482–485.

- Foschini, M. P., Gaiba, A., Cocchi, R., Pennesi, M. G., Gatto, M. R., Frezza, G. P., & Pession, A. (2004). Pattern of p63 expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology*, 444(4), 332–9.
- França, C.M., Dedivitis, R.A., Sementili, A., Martins, M.D. & Pfuetszenreiter E.G. (2007). Marcação imunohistoquímica da p63 em carcinoma espinocelular de boca e orofaringe e comparação com os graus de malignidade, *Revista Brasileira de Cirurgia da Cabeça e Pescoço*, 4, 212–214.
- Franchi, A., Gallo, O., Boddi, V. & Santucci, M. (1996). Prediction of occult neck metastases in laryngeal carcinoma: role of proliferating cell nuclear antigen, MIB-1, and E-cadherin immunohistochemical determination, *Clinical Cancer Research*, 2, 1801–1808.
- Gama, P. (2008). O Trato Digestivo. In L.C., Junqueira & J. Carneiro (Eds.), *Histologia Básica* (11th ed.). (pp. 283-286). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Gelberg, H.B. (2009). Sistema digestório. In M.D., McGavin & J.F., Zachary (Eds.), *Bases da Patologia em Veterinária* (4th ed.). (pp. 309-310). Rio de Janeiro: Elsevier.
- Greene, F., Page, D.L., Fleming, I.D., Fritz, A.G., Balch, C.M., Haller, D.G. & Morrow, M. (Eds.) (2002). *AJCC Cancer Staging Manual* (6th ed.). Illinois: Springer.
- Hagiwara, K., McMenamin, M.G., Miura, K. & Harris, C.C. (1999). Mutational analysis of the p63/p73L/p51/p40/CUSP/KET gene in human cancer cell lines using intronic primers, *Cancer Research*, 59, 17, 4165–4169.
- Head, K.W., Else, R.W. & Dubielzig, R.R. (2002). Tumors of the Alimentary Tract. In D. J. Meuten (Ed.). *Tumors in Domestic Animals* (4th ed.). (pp. 425-427). Iowa: Blackwell.
- Heffner, D. K. (2002). Let's make grading of squamous cell carcinomas more meaningful to clinicians (via "ed's insight"). *Annals of Diagnostic Pathology*, 6(6), 399–403.
- Henry, C.J. & Higginbotham, M.L. (2010). Tumors of the Head and Neck. In C.J., Henry & M.L., Higginbotham (Eds.). *Cancer Management in Small Animal Practice*. (pp. 195-203). Missouri: Saunders Elsevier.
- Hutson, C.A., Willaner, C.C., Walder, E.J., Stone, J.L. & Klein, M.K. (1992). Treatment of mandibular squamous cell carcinoma in cats by use of mandibulectomy and radiotherapy: Seven cases (1987–1989), *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 201, 777–781.
- Hutson, C.A., Willauer, C.C., Walder, E.J., Stone, J.L. & Klein, M.K. (1992). Treatment of mandibular squamous cell carcinoma in cats by use of mandibulectomy and radiotherapy: seven cases (1987–1989), *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 201(5), 777–781.
- Iatropoulos, M.J. & Williams, G.M. (1996). Proliferation markers, *Experimental and Toxicologic Pathology*, 48, 175–181.
- Jamadar, S., Narayan, T. V, Shreedhar, B., Mohanty, L., & Shenoy, S. (2014). Comparative study of various grading systems in oral squamous cell carcinoma and their value in predicting

lymph node metastasis. *Indian Journal of Dental Research : Official Publication of Indian Society for Dental Research*, 25(3), 357–63.

- Johnson N, Franceschi S, Ferlay J, Ramadas K, Schmid S MD et al. Squamous cell carcinoma. In: Barnes L, Evenson JW, Reichart P, Sidransky. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics: Head and Neck Tumors. Lyon: IARC Press; 2005.
- Jones, P.D., Lorimier, L.P., Kitchell, B.E. & Losonsky, J.M. (2003). Gemcitabine as a Radiosensitizer for Nonresectable Feline Oral Squamous Cell Carcinoma, *J Am Anim Hosp Assoc*, 39, 463–467.
- Kato, K., Kawashiri, S., Yoshizawa, K., Kitahara, H., Okamune, A., Sugiura, S., Noguchi, N. & Yamamoto, E. (2011). Expression form of p53 and PCNA at the invasive front in oral squamous cell carcinoma: Correlation with clinicopathological features and prognosis, *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 40(9), 693–698.
- Keshav, R. & Narayanappa, U. (2015). Expression of Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) in Oral Submucous Fibrosis: An Immunohistochemical Study, *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9(5), 20–23.
- Keski-Säntti, H., Atula, T., Tikka, J., Hollmén, J., Mäkitie, A. A. & Leivo, I. (2007). Predictive value of histopathologic parameters in early squamous cell carcinoma of oral tongue, *Oral Oncology*, 43(10), 1007–1013.
- Keum, K.C., Chung, E.J., Koom, W.S., Cho, J.H., Cho, S.H., Choi, E.C., Lee, C.G., Suh, C.O. & Kim, G.E. (2006). Predictive value of p53 and PCNA expression for occult neck metastases in patients with clinically node-negative oral tongue cancer, *Journal of Otolaryngology - Head & Neck Surgery*, 135, 858–64.
- King, K.E., Ha, L., Camilli, T. & Weinberg, W.C. (2013). Delineating Molecular Mechanisms of Squamous Tissue Homeostasis and Neoplasia: Focus on p63, *Journal of Skin Cancer*, 2013
- Koga, F., Kawakami, S., Fujii, Y., Saito, K., Ohtsuka, Y., Iwai, A., Ando, N., Takizawa, T., Kageyama, Y. & Kihara, K. (2003). Impaired p63 Expression Associates with Poor Prognosis and Uroplakin III Expression in Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder, *Clinical Cancer Research*, 9, 5501–5507.
- Krecicki, T., Jeleń, M., Zalesska-Krecicka, M., Rak, J., Szkudlarek, T., & Jeleń-Krzeszewska, J. (1999). Epidermal growth factor receptor (EGFR), proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 antigen in laryngeal epithelial lesions, *Oral Oncology*, 35(2), 180–6.
- Lauxen, I.S., Oliveira, M.G., Rados, P.V., Lingen, M.W., Nor, J.E. & Sant’Ana Filho, M. (2014). Immunoprofiling of oral squamous cell carcinomas reveals high p63 and survivin expression, *Oral Diseases*, 20(3), 76–80.
- Liptak, J.M. & Withrow, S.J. (2013). Chapter 22: Cancer of the gastrointestinal tract. Section A.
- Lo Muzio, L., Campisi, G., Farina, A., Rubini, C., Pastore, L., Giannone, N., Colella, G., Leonardi, R. & Carinci, F. (2007). Effect of p63 expression on survival in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Investigation*, 25(6), 464–469.

- Lo Muzio, L., Santarelli, A., Caltabiano, R., Rubini, C., Pieramici, T., Trevisiol, L., Carinci, F., Leonardi, R., De Lillo, A., Lanzafame, S., Bufo, P. & Piattelli, A. (2005). p63 overexpression associates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma, *Human Pathology*, 36, 187–94.
- Loljung, L., Coates, P. J., Nekulova, M., Laurell, G., Wahlgren, M., Wilms, T., Widlof, M., Hansel, A. & Nylander, K. (2014). High expression of p63 is correlated to poor prognosis in squamous cell carcinoma of the tongue, *Journal of Oral Pathology & Medicine : Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 43(1), 14–9
- Lourenço, S.D.Q.C., Schueler, A.F., Camisasca, D.R., Lidenblatt, R.D.C. & Bernardo, V.G. (2007). Classificações Histopatológicas para o Carcinoma de Células Escamosas da Cavidade Oral: Revisão de Sistemas Propostos, *Revista Brasileira de Cancerologia*, 53(3), 325–333.
- Madewell, B.R. (2001). Cellular Proliferation in Tumors: A Review of Methods, Interpretation, and Clinical Applications, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 15, 334–340.
- Mangiulli, M., Valletti, A., Caratozzolo, M.F., Tullo, A., Sbisà, E., Pesole, G. & D’Erchia, A. M. (2009). Identification and functional characterization of two new transcriptional variants of the human p63 gene, *Nucleic Acids Research*, 37(18), 6092–6104.
- Massion, P.P., Taflan, P.M., Rahman, S.M.J., Yildiz, P., Shyr, Y., Edgerton, M.E., Westfall, M.D., Roberts, J.R., Pietenpol, J.A., Carbone, D.P. & Gonzalez, A.L. (2003). Significance of p63 Amplification and Overexpression in Lung Cancer Development and Prognosis, *Cancer Research*, 63(21), 7113–7121.
- Mestrinho, L.A., Pissarra, H., Faísca, P., Bragança, M., Peleteiro, M.C., & Niza, M.M.R.E. (2014a). PCNA and grade in 13 canine oral squamous cell carcinomas: Association with prognosis, *Veterinary and Comparative Oncology*, 1–7.
- Mestrinho, L.A., Faísca, P., Peleteiro, M.C., & Niza, M.M.R.E. (2014b). p63 and E-cadherin Expression in Canine Oral Squamous Cell Carcinoma, *Veterinary Pathology*, 1-7.
- Moergel, M., Abt, E., Stockinger, M., & Kunkel, M. (2010). Overexpression of p63 is associated with radiation resistance and prognosis in oral squamous cell carcinoma, *Oral Oncology*, 46(9), 667–671.
- Moore, A.S. (2010). Practical Chemotherapy. In S.J., Ettinger & E.C., Feldman (Eds.), *Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and the cat*. (7th ed.). (pp. 2131-2138). Missouri: Saunders Elsevier.
- Moraes, S. (2008). Pele e Anexos. In L.C., Junqueira & J. Carneiro (Eds.), *Histologia Básica* (11th ed.). (pp. 283-286). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Myoung, H., Kim, M.J., Lee, J.H., Ok, Y.J, Paeng, J.Y. & Yun, P.Y. (2006). Correlation of proliferative markers (Ki-67 and PCNA) with survival and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: a clinical and histopathological analysis of 113 patients, *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 35(11), 1005–1010.

- Nanci, A. (2012a). Structure of oral tissues. In A. Nanci (Ed.), *Ten Cate's Oral Histology*. (8th ed.). (pp. 1-13). USA: Elsevier Mosby.
- Nanci, A. (2012b). Oral Mucosa. In A. Nanci (Ed.), *Ten Cate's Oral Histology*. (8th ed.). (pp. 278-310). USA: Elsevier Mosby.
- Northrup, N.C., Selting, K.A., Rassnick, K.M., Kristal, O., O'Brien, M.G., Dank, G., Dhaliwal, R.S., Jagannatha, S., Cornell K.K. & Gieger, T.L. (2006). Outcomes of cats with oral tumors treated with mandibulectomy: 42 cases, *Journal of the American Animal Hospital Association*, 42, 350–360.
- Nylander, K., Coates, P. J., & Hall, P.A. (2000). Characterization of the expression pattern of p63 alpha and delta Np63 alpha in benign and malignant oral epithelial lesions. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 87(3), 368–72.
- Oliveira, L.R., Ribeiro-Silva, A., Costa, J.P.O., Simões, A.L., Matteo, M.A.S. Di & Zucoloto, S. (2008). Prognostic factors and survival analysis in a sample of oral squamous cell carcinoma patients, *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 106(5), 685–95.
- Oral tumors. In Withrow, S.J., Vail, D.M. & Page, R.L. (Eds.), *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. (5th ed.). (pp. 381-398). USA: Elsevier.
- Owen, L. (1980). TNM classification of tumors in domestic animals. Geneva, World Health Organization.
- Paoloni, M.C. & Vail, D.M. (2013). Chapter 17: Clinical Trials and Development Therapeutics. In Withrow, S.J., Vail, D.M. & Page, R.L. (Eds.), *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. (5th ed.). (pp. 293-302). USA: Elsevier.
- Parsa, R., Yang, A., McKeon, F. & Green, H. (1999). Association of p63 with proliferative potential in normal and neoplastic human keratinocytes, *Journal of Investigative Dermatology*, 113, 6, 1099–1105.
- Poosarla, C., Ramesh, M., Ramesh, K., Gudiseva, S., Bala, S. & Sundar, M. (2015). Proliferating Cell Nuclear Antigen in Premalignancy and Oral Squamous Cell Carcinoma, *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9(6), ZC39–41.
- Pruneri, G., Pignataro, L., Manzotti, M., Carboni, N., Ronchetti, D., Neri, A., Cesana, B.M. & Viale, G. (2002). p63 in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma: Evidence for a Role of TA-p63 Down-Regulation in Tumorigenesis and Lack of Prognostic Implications of p63 Immunoreactivity, *Laboratory Investigation*, 82(10), 1327–1334.
- Radlinsky, M.G. (2013). Surgery of the Digestive System. In T.W., Fossum (Ed.), *Small Animal Surgery*. (4th ed.). (pp. 412-416). Missouri: Elsevier Mosby.
- Re, M., Zizzi, A., Ferrante, L., Stramazotti, D., Goteri, G., Gioacchini, F. M., Olivieri, F., Magliulo, G. & Rubini, C. (2014). p63 and Ki-67 immunostainings in laryngeal squamous cell carcinoma are related to survival. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 271(6), 1641–1651.

- Reeves, N.C., Turrel, J.M. & Withrow, S.J. (1993). Oral squamous cell carcinoma in the cat, *Journal of the American Animal Hospital Association*, 29, 438.
- Sawazaki-Calone, I. (2014). *O valor prognóstico dos sistemas de graduação histopatológica em carcinomas espinocelulares orais*. Tese de Doutorado em Patologia. São Paulo: Faculdade Estadual de Campinas – Faculdade de Odontologia de Piracicaba.
- Sawazaki-Calone, I., Rangel, A.L.C.A., Bueno, A.G., Morais, C.F., Nagai, H.M., Kunz, R.P., Sousa, R.L., Rutkauskis, L., Almangush, A. & Coletta, R.D. (2015). The prognostic value of histopathological grading systems in oral squamous cell carcinomas. *Oral Diseases*, 21(6), 755–761.
- Scully, C., & Bagan, J. V. (2009). Oral squamous cell carcinoma: Overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications, *Oral Diseases*, 15(6), 388–399.
- Senoo, M., Tsuchiya, I., Matsumura, Y., Mori, T., Saito, Y., Kato, H., Okamoto, T. & Habu, S. (2001). Transcriptional dysregulation of the p73L / p63 / p51 / p40 / KET gene in human squamous cell carcinomas: expression of Delta Np73L, a novel dominant-negative isoform, and loss of expression of the potential tumour suppressor p51, *British Journal of Cancer*, 84(9), 1235–1241.
- Shingaki, S., Suzuki, I., Nakajima, T., & Kawasaki, T. (1988). Evaluation of histopathologic parameters in predicting cervical lymph node metastasis of oral and oropharyngeal carcinomas. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 66(6), 683–688.
- Sinha, A., Chandra, S., Raj, V., Zaidi, I., Saxena, S., & Dwivedi, R. (2015). Expression of p63 in potentially malignant and malignant oral lesions, *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 5(3), 165–172.
- Snyder, L.A., Bertone, E.R., Jakowski, R.M., Dooner, M.S., Jennings-Ritchie, J. & Moore, A.S. (2004). P53 Expression and Environmental Tobacco Smoke Exposure in Feline Oral Squamous Cell Carcinoma, *Veterinary Pathology*, 41, 209–214.
- Staibano, S., Mignogna, M.D., Lo Muzio, L., Di Alberti, L., Di Natale, E., Lucariello, A., Mezza, E., Bucci, E. & DeRosa, G. (1998). Overexpression of cyclin-D1, bcl-2, and bax proteins, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), and DNA-ploidy in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Human Pathology*, 29, 1189–94.
- Stoimenov, I. & Helleday, T. (2009). PCNA in the crossroad of cancer, *Biochemical Society Transactions*, 37, 605–13.
- Störkel, S., Reichert, T., Reiffen, K. A. & Wagner, W. (1993). EGFR and PCNA expression in oral squamous cell carcinomas-a valuable tool in estimating the patient's prognosis, *European Journal of Cancer. Part B: Oral Oncology*, 29(4), 273–277.
- Supsavhad, W., Dirksen, W.P., Martin, C.K., & Rosol, T.J. (2015). Animal models of head and neck squamous cell carcinoma, *Veterinary Journal*.
- Takahashi, Y., Noguchi, T., Takeno, S., Kimura, Y., Okubo, M. & Kawahara, K. (2006). Reduced expression of p63 has prognostic implications for patients with esophageal squamous cell carcinoma, *Oncology Reports*, 15(2), 323–328.
- Thurfjell, N., Coates, P.J., Boldrup, L., Lindgren, B., Bäcklund, B., Uusitalo, T., Mahani, D., Dabelsteen, E., Dahlqvist, A., Sjöström, B., Roos, G., Vojtesek, B., Nenutil, R. &

- Nylander, K. (2005). Function and importance of p63 in normal oral mucosa and squamous cell carcinoma of the head and neck, *Advances in Oto-Rhino-Laryngology*, 62, 49–57.
- Varun, B. R., Ranganathan, K., Rao, U. K., & Joshua, E. (2013). Immunohistochemical detection of p53 and p63 in oral squamous cell carcinoma, oral leukoplakia, and oral submucous fibrosis, *J Investig Clin Dent*, 214–219.
- Wang, B., Zhang, S., Yue, K. & Wang, X. (2013). The recurrence and survival of oral squamous cell carcinoma: a report of 275 cases, *Chinese Journal of Cancer*, 32, 11.
- Wang, S.C. (2014). PCNA: A silent housekeeper or a potential therapeutic target? *Trends in Pharmacological Sciences*, 35(4), 178–186.
- Wiles, V., Hohenhaus, A., Lamb, K., Zaidi, B., Camps-palau, M., & Leibman, N. (2016). Retrospective evaluation of toceranib phosphate (Palladia) in cats with oral squamous cell carcinoma, *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 1-9.
- Willard, M.D. (2014). Disorders of the Oral cavity, Pharynx, and Esophagus. In R.W., Nelson & C.G., Couto (Eds.), *Small Animal Internal Medicine* (5th ed.). (pp. 428-430). Missouri: Elsevier Mosby.
- Woolgar, J. A. (2006). Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, 42(3), 229–239
- Wypij, J.M. (2013). A naturally occurring feline model of head and neck squamous cell carcinoma. *Pathology Research International*.
- Yang, a, Schweitzer, R., Sun, D., Kaghad, M., Walker, N., Bronson, R. T., Tabin, C., Sharpe, A., Caput, D., Crum, C. & McKeon, F. (1999). P63 Is Essential for Regenerative Proliferation in Limb, Craniofacial and Epithelial Development. *Nature*, 398(6729), 714–718.
- Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M. D., Caput, D., Dotsch, V., Andrews, N.C., Caput, D. & Mckeon, F. (1998). p63 , a p53 Homolog at 3q27–29 , Encodes Multiple Products with Transactivating, Death-Inducing, and Dominant-Negative Activities, *Molecular Cell*, 2, 305-316.

Anexos

Anexo I – Tabelas para análise de testes de correlação

Tabela de avaliação qualitativa do grau de correlação entre duas variáveis (adaptado de Callegari-Jacques, 2003).

$ r $	A correlação é dita
0	Nula
0 - 0,3	Fraca
0,3 - 0,6	Regular
0,6 - 0,9	Forte
0,9 - 1	Muito forte
1	Plena ou perfeita

Tabela dos valores críticos para o coeficiente de correlação de *Spearman* (r_s) para postos (adaptado de Callegari-Jacques, 2003).

n	α Bilateral	0,50	0,20	0,10	0,05
	α Unilateral	0,25	0,10	0,05	0,025
16		0,182	0,341	0,429	0,503
17		0,176	0,328	0,414	0,485
18		0,170	0,317	0,401	0,472
19		0,165	0,309	0,391	0,460
20		0,161	0,380	0,380	0,447